

# Kjemisk og biologisk karakterisering av bærekstrakter fra svarthyll, *Sambucus nigra*

**Tone Opsahlseter**



Masteroppgave ved avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk instiutt

UNIVERSITETET I OSLO

2008

# Kjemisk og biologisk karakterisering av bærekstrakter fra svarthyll, *Sambucus nigra*

Masteroppgave ved avdeling for farmasøytisk kjemi  
Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Tone Opsahlseter  
Oslo, mai 2008

Veiledere:  
Hilde Barsett  
Torun Aslaksen  
Terje Michaelsen

## Forord

Denne masteroppgaven ble utført i perioden januar 2007 – mai 2008, ved avdeling for farmasøytisk kjemi, farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo. God faglig kompetanse på avdelingen, i kombinasjon med et meget trivelig miljø, har gjort at arbeidet med oppgaven har vært lærerikt, spennende og morsomt. I løpet av perioden jeg har jobbet med min masteroppgave har jeg fått god hjelp av alle på avdelingen. Det er også noen jeg ønsker å takke spesielt:

- Veilederen min Hilde Barsett, for god oppfølging og hjelp underveis, i tillegg til humor og tilstedeværelse.
- Medveileder Torun Aslaksen, for fantastisk veiledning på laboratoriet, for hjelp til å finne artikler, og i tillegg faglig hjelp i tide og utide.
- Terje Michaelsen, for å ha ordnet så vi fikk benytte folkehelseinstituttet.
- Hege Christensen og Siri Johannesen, for veiledning og faglig hjelp under forsøket med midazolam.
- Mine medlaboranter, Lise-Lotte Stange-Bekkevold og Anette Lofthus, som har gjort hverdagen utholdbar.
- Silje Glæserud og Siw Enger, for støtte og oppmuntring underveis, og for et artig hovedfagsår.
- Delia Murangi, for at du har vært så tålmodig, og for at du alltid er der for meg.
- Sist men ikke minst, Hans-Gunnar Vold for hjelp til korrekturlesing og setningsformulering, men ikke minst tålmodighet og oppmuntring. Du er best!

*Oslo, mai 2008*

*Tone Opsahlseter*

# Innhold

<b>1. FORKORTELSER.....</b>	<b>6</b>
<b>2. REAGENSliste .....</b>	<b>9</b>
<b>3. SAMMENDRAG .....</b>	<b>11</b>
<b>4. INNLEDNING .....</b>	<b>13</b>
4.1 SVARTHILL, <i>SAMBUCUS NIGRA</i> .....	13
4.1.1 Taksonomisk klassifisering .....	13
4.1.2 Botanikk .....	14
4.1.3 Myter og gammel folketro .....	15
4.1.4 Folkemedisinsk bruk.....	15
4.1.5 Biologisk aktivitet.....	16
4.2 POLYSAKKARIDER I PLANTER .....	18
4.2.1 Plantecelleveggen.....	19
4.2.2 Cellulose og hemicellulose .....	20
4.2.3 Pektintype polysakkarider.....	20
4.2.4 Komplementsystemet.....	24
4.2.5 Makrofager .....	25
4.2.6 Cytokrom p450 systemet .....	28
<b>5. OPPGAVENS MÅL .....</b>	<b>30</b>
<b>6. METODER.....</b>	<b>31</b>
6.1 GENERELLE METODER.....	31
6.1.1 Vannkvalitet .....	31
6.1.2 Innveining av stoff .....	31
6.1.3 Volumreduksjon .....	31
6.1.4 Filtrering.....	31
6.1.5 Syrevasking av glassutstyr .....	32
6.1.6 Frysetørring.....	32
6.1.7 Fenol-svovelsyretest .....	33
6.1.8 Dialyse.....	34
6.2 EKSTRAKSJON AV SVARTHILLBÆR .....	35
6.2.1 Ekstraksjon med diklormetan .....	36
6.2.2 Ekstraksjon med 96 % etanol (1).....	36
6.2.3 Ekstraksjon med 96% etanol (2).....	37
6.2.4 Ekstraksjon med 50 % etanol .....	37



6.2.5	Ekstraksjon med 50 °C vann .....	38
6.2.6	Ekstraksjon med 100 °C vann .....	39
6.3	OPPRENSING OG ISOLERING AV POLYSAKKARIDER .....	39
6.3.1	Adsorpsjonskromatografi med Amberlite XAD-7HP .....	39
6.3.2	Gelfiltrering med Bio-Gel® P-6 Polyacrylamide Gel .....	41
6.3.3	Ionebytterkromatografi med ANX sepharose .....	44
6.4	BIOLOGISK AKTIVITET .....	46
6.4.1	Komplementfikseringstest .....	46
6.4.2	Antimikrobiell effekt – disc diffusion .....	50
6.4.3	Påvirkning på CYP3A4 + b5 – metabolisme av midazolam .....	52
6.4.4	Måling av NO-frigjøring fra makrofager – Greiss Reagent System .....	56
6.5	MONOSAKKARIDBESTEMMELSE .....	59
6.5.1	Metanolyse, TMS-derivatisering og GC-FID .....	59
6.6	STRUKTUR OG BINDINGSFORHOLD .....	62
6.6.1	Metylering .....	62
6.6.2	Innhold av arabinogalaktan II - Yariv Reagent System .....	70
<b>7.</b>	<b>RESULTATER .....</b>	<b>73</b>
7.1	EKSTRAKSJON AV SVARTHULLBÆR .....	73
7.2	ISOLERING OG OPPRENSING AV POLYSAKKARIDER .....	74
7.2.1	Adsorpsjonskromatografi med Amberlite XAD-7 HP .....	74
7.2.2	Gelfiltrering med Bio-Gel® P-6 .....	75
7.2.3	Ionebytterkromatografi med ANX sepharose .....	76
7.3	BIOLOGISK AKTIVITET .....	76
7.3.1	Komplementfiserende aktivitet .....	76
7.3.2	Antimikrobiell effekt .....	81
7.3.3	Påvirkning på CYP3A4 + b5 – metabolisme av midazolam .....	83
7.3.4	Makrofagaktivering .....	86
7.4	MONOSAKKARIDSAMMENSETNING .....	87
7.5	STRUKTUR OG BINDINGSFORHOLD .....	90
7.5.1	Metylering .....	92
7.5.2	Innhold av arabinogalaktan II (AG-II) .....	97
<b>8.</b>	<b>KONKLUSJON .....</b>	<b>98</b>
	<b>KILDELISTE .....</b>	<b>99</b>

## 1. Forkortelser

AG	Arabinogalaktan
AGPs	Arabinogalaktanproteiner
Ara	Arabinose
B	Bio-Gel® P-6 fraksjon
BSA	Bovine Serum Albumin
COX	Cyclooxygenase
CR3	Komplementreseptor 3
CYP450	Cytokrom P450
DIA	Diazepam
DMSO	Dimetylsulfoksid
ECG	Forkortelse for komplementdonor
FID	Flammeioniseringsdetektor
Fuc	Fucose
G-	Gram negativ
G+	Gram positiv
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
GFA	Glassmikrofiber filter
GlcA	Glukuronsyre
Glu	Glukose
HGA	Homogalakturonan
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMW	Høy molekylvekt
HSV-1	Herpes simplex virus 1
ICH50	Konsentrasjonen som gir 50% hemming av hemolyse
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IMW	Intermediær molekylvekt
LC	Liquid Chromatography
LMH	Legemiddel med hydrogen
LMOH	Legemiddel med hydroksyl
LMW	Lav molekylvekt
LPS-R	Lipopolysakkaridreseptor
Man	Mannose
Me	Metyl
MS	Massespektrometer
Mw	Molekylvekt
N	Negativ kontroll
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NED	Naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED)
NO	Nitrogenoksid
ODC	Ornithine decarboxylase
OH	Hydroksyl
P	Positiv kontroll
PMII	Plantago Major, fraksjon II

---

QR	Quinone reductase
RG	Rhamnogalakturonan
Rha	Rhamnose
ROS	Reaktive oksygen species
RPM	Rotasjoner per minutt
SRBC	Sensibiliserte røde blodceller fra sau
TFA	Trifluor eddiksyre
TLR4	Toll-likereseptor 4
TLRs	Toll-likereseptorer
TMS	Tetrametylsilan
TNF-a	Tumor nekrose faktor-a
UV	Ultraviolet
V	Vannekstrakt
XGA	Xylogalakturonan
Xyl	Xylose
96%RÅ	Fraksjon fra 96 % etanol råekstrakt
50%RÅ	Fraksjon fra 50 % etanol råekstrakt
50%MET	Fraksjon fra 50 % etanolekstrakt, eluert fra Amberlite XAD-7 HP med metanol
50%AMB	Fraksjon fra 50 % etanolekstrakt, eluert fra Amberlite XAD-7 HP med vann
50%B	Fraksjon fra 50 % etanolekstrakt, isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel® P-6 Polyacrylamide Gel
50%S1	Fraksjon fra 50 % etanolekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
50%S2	Fraksjon fra 50 % etanolekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
50%S3	Fraksjon fra 50 % etanolekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
50%S4	Fraksjon fra 50 % etanolekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
50%S5	Fraksjon fra 50 % etanolekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
50vRÅ	Fraksjon fra 50 °C vann råekstrakt
50vB	Fraksjon fra 50 °C vannekstrakt, isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel® P-6 Polyacrylamide Gel
50vS1	Fraksjon fra 50 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
50vS2	Fraksjon fra 50 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
50vS3	Fraksjon fra 50 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
50vS4	Fraksjon fra 50 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
50vS5	Fraksjon fra 50 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
100vRÅ	Fraksjon fra 100 °C vann råekstrakt
100vB <sub>1</sub>	Fraksjon fra 100 °C vannekstrakt, første del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel® P-6 Polyacrylamide Gel (ikke tatt vare på for testing)

---

100vB <sub>2</sub>	Fraksjon fra 100 °C vannekstrakt, andre del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel® P-6 Polyacrylamide Gel
100vB <sub>1</sub> S1	Fraksjon fra 100 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
100vB <sub>1</sub> S2	Fraksjon fra 100 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
100vB <sub>1</sub> S3	Fraksjon fra 100 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
100vB <sub>1</sub> S4	Fraksjon fra 100 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
100vB <sub>1</sub> S5	Fraksjon fra 100 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
100vB <sub>2</sub> S1	Fraksjon fra 100 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
100vB <sub>2</sub> S2	Fraksjon fra 100 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
100vB <sub>2</sub> S3	Fraksjon fra 100 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
100vB <sub>2</sub> S4	Fraksjon fra 100 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)
100vB <sub>2</sub> S5	Fraksjon fra 100 °C vannekstrakt, isolert etter ionebytterkromatografi på ANX sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)

## 2. Reagensliste

1-metylimidazol	Fluka
Aceton	Chemi-teknik
Acetonitril	Merck
Agarosepulver	Bio-Rad
ANX sepharose	Amersham Biosciences
Arabisk gummi ( <i>Acacia gum</i> ) 1 mg/ml	
Argongass	AGA
Bacillus subtilis (ATCC 6633)	Remel
Barium klorid	Merck
b-glukosyl Yariv [1,3,5-tris (4-b-D-glucopyranosyl oxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxy-benzene] 2 mg/ml	Biosupplies
Bio-Gel® P-6 Polyacrylamide Gel	Bio Rad
Bloderytrocytter fra sau 131, tappet 11/10-07	Folkehelseinstituttet
Bloderytrocytter fra sau 131, tappet 17/01-08	Folkehelseinstituttet
BSA bovine serum albumin (30%) tilsatt 0,1% NaN <sub>3</sub>	Folkehelseinstituttet
Candida albicans (ATCC 10231)	Oxoid
Carbodiimid, N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonate (CMC)	Aldrich
CYP3A4 + b5, fortytning 1:64 (16 ml + 984 ml Lise Madsen buffer)	
Dextran T500 Mw 500 000	Pharmacia Fine Chemicals
Diazepam 0,044 mM	Diakonhjemmet
Diklormetan	Fluka
Dimetylsulfoksid, DMSO	Merck
Eddiksyreanhydrid	Merck
Eschericia coli (ATCC 25922)	Oxoid
Etanol	Merck
Etylacetat	Merck
Fenol	Merck
Fysiologisk saltvann 0,9 % natriumklorid	Braun
Gentamicin (C 1264)	Sigma
Greiss Reagent A: Sulfanilamid-løsning 1%	Rikshospitalet
Greiss Reagent B: N-(1-naptyl)etylendiamin (NED) 2,5% fosforsyre	Rikshospitalet
Heksametyldisilazan	Aldrich
Heliumgass	AGA
Imidazol	Fluka
Iseddik	Merck
Isoton buffer II	Rikshospitalet
Kokurus rhizinophilia (ATCC 9341)	Oxoid
Kolorform	Prolabo
Komplement fra ECG i veronalbuffer (1:40)	Folkehelseinstituttet
Lipopolysakkarid, LPS	Rikshospitalet
Lise Madsen buffer (0,25 M sukrose, 10 mM HEPES, 2 mM EDTA)	BD Gentest
Magnesiumsulfoksid, MgSO <sub>4</sub>	Merck

---

Mannitol	Sigma
McFarland standard 2: 0,2 ml 1.0% Barium chloride og 9,8 ml 1.0% Sulfuric acid	
MES 0,2M (2-[N-Morpholino] etan svovelsyre)	Sigma
Metanol	Sigma-Aldrich
Metyljodid, CH <sub>3</sub> I	Fluka
Midazolamløsning 20 mM	Avdeling for farmasøytisk biokjemi
Mobilfase A (0,05 M ammoniumformiat-buffer pH 4,4, NH <sub>3</sub> 25 % 4,036 ml, konsentrert HCOOH 2,125 ml, ionebyttet vann 1 L)	
Mobilfase B (95 % acetonitril og 5 % metanol)	
NADPH	Sigma-Aldrich
Natriumazid, NaN <sub>3</sub>	Merck
Natriumborodeuterid, NaBD <sub>4</sub>	Isotec
Natriumhydroksid, NaOH, pellets	Merck
Natriumtiosulfat	Merck
Natriumklorid, NaCl	Prolabo
Nitrogengass	AGA
<i>Plantago major</i> , fraksjon II, PMII (1 mg/ml)	Folkehelseinstituttet
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Oxoid
Pyridin	Merck
Raffinose D(+), R-0250, Mw 594,5	Sigma
RPMI 1640, tilsatt 10% kalveserum, 1% penicillin/streptomycin og 2 mM L-glutamin, 5 × 10 <sup>-5</sup> M 2-mercaptoetanol	Rikshospitalet
Sigma XAD-7 HP	Sigma
Sølvnitrat, AgNO <sub>3</sub>	Merck
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Remel
Sulconazol (0,5 mg/ml)	Sigma
Svovelsyre, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> konsentrert	Merck
TMS-reagens: 1 ml Trimetylklorosilan (TMCS), 2 ml Heksametyldisilazan og 5 ml vannfri pyridin	
Trifluoreddiksyre, TFA 2,5M	Merck
Trimetylklorosilan, TMCS	Supelco
Trisbuffer	Sigma-Aldrich
TRIZMA (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)	Sigma
Veronal/BSA buffer: CFT pH 7,2 med 2 mg/ml bovine serum albumin (BSA) 30 % og 0,02 % NaN <sub>3</sub> -løsning	Folkehelseinstituttet
Virion 9020 amboceptor serum hemolysis	Folkehelseinstituttet

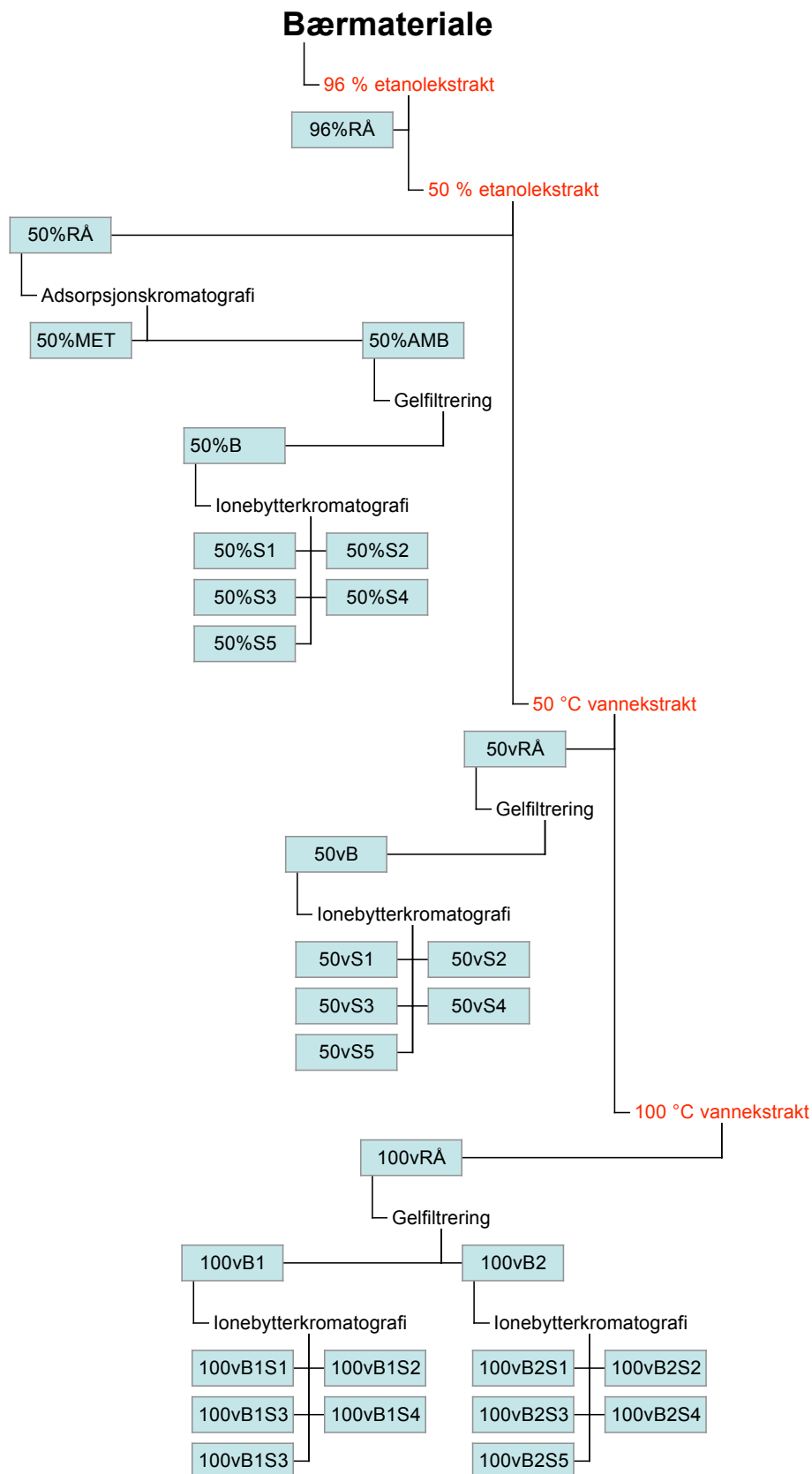
### 3. Sammendrag

*Sambucus nigra*, svarthyll, er en utbredt og mye anvendt plante med lang tradisjon innen folkemedisin. Blomstenes innholdsstoffer og effekt er noe undersøkt, men det er gjort få studier på innholdsstoffer og effekt på svarthyllbærene.

Svarthyllbær ble ekstrahert med metanol, 96 % etanol, 50 % etanol, 50 °C vann og 100 °C vann. Ved å rense og fraksjonere ekstraktene med adsorpsjonskromatografi, gelfiltrering og ionebytterkromatografi ble polysakkaridfraksjoner isolert på bakgrunn av molekylstørrelse og ladning. Totalt ble det samlet opp 30 fraksjoner. Figur 3-1 viser en forenklet oversikt over ekstraksjon- og isoleringsprosessen.

Polysakkaridfraksjonene ble analysert med tanke på komplementfikserende, antimikrobiell, makrofagaktiverende og CYP-hemmende effekt. I tillegg ble monosakkaridsammensetningen bestemt, og noen av polysakkaridfraksjonene ble også testet for bindingsmønster og innhold av arabinogalaktaner.

Resultatene indikerer at omtrent alle fraksjonene har høy komplementfikserende aktivitet, høyere enn PMII-standard som er isolert fra bladene til *Plantago major*. Fraksjonene fra 50 % etanolekstraktet hadde høyere komplementfikserende aktivitet enn de andre, og 50%S3 ser ut til å være den aller mest aktive fraksjonen. Resultatene tyder også på at ekstrakter av svarthyllbær kan ha svak makrofagaktiverende og antimikrobiell effekt, men dette må bekreftes med flere studier. Påvirkningen på CYP3A4 ble undersøkt og resultatene var overraskende, ettersom det tyder på CYP-hemming fra lavmolekylære fraksjoner og CYP-stimulering fra høymolekylære sure fraksjoner. Analysen av monosakkaridsammensetningen i fraksjonene tyder på innhold av pektintype polysakkarider. Det ser ut til å være høyest innhold av arabinose, galaktose, galakturonsyre, glukose, mannose og xylose. Ved felling med Yariv reagens ble det påvist innhold av arabinogalaktaner i råekstraktene, samt i alle de sure fraksjonene. 50%S2-S4 og 50vS2 ser ut til å ha størst innhold av arabinogalaktaner. Bindingsmønsteret i 4 utvalgte fraksjoner med høy komplementfikserende aktivitet (50%S1, 50%S3, 50vS1 og 100vB<sub>1</sub>S2) ble undersøkt, og resultatene tyder på innhold av strukturer som AG-II, RG-I og noe AG-I, som tidligere er dokumentert å ha komplementfikserende aktivitet. Det ser også ut til at 50vS1 inneholder xyloglukaner og mulig galaktomannaner, noe som er vanlige polysakkarider isolert fra frømateriale.



Figur 3-1 Flytskjema som viser opprensing og fraksjonering av ekstraktene. Figuren viser kun de fraksjonene som ble undersøkt. RÅ; råekstrakt, v; vann, MET; metanolekstrakt fra Amberlite XAD-7, AMB; første fraksjon eluert med vann fra Amberlite XAD-7, B; fraksjon isolert etter gelfiltrering med Bio-Gel P-6, S; sure fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi med ANX sepharose.



## 4. Innledning

### 4.1 Svarthyll, *Sambucus nigra*

#### 4.1.1 Taksonomisk klassifisering

(Donoghue *et al.*, 2001; Bell, 2004)

Rike:	Planterike
Divisjon:	Magnoliophyta
Klasse:	Magnoliopsida
Orden:	Dipsacales
Familie:	Adoxaceae*
Slekt:	<i>Sambucus</i>
Art:	<i>Sambucus nigra</i>



Bilde 4-1 *Sambucus nigra* (Wikipedia, 2008)

\*Svarthyll ble tidligere plassert i familien Caprifoliaceae, men ut i fra kombinerte morfologiske og molekylære analyser, går svarthyll nå sammen med moskusurt, *Adoxa*, i Adoxaceae familien.

### 4.1.2 Botanikk

Svarthyll (*Sambucus nigra*) er en busk eller et lite tre som vanligvis blir 3-5 meter høyt, men aldri over 10 meter. Stammen har gråaktig bark, bladene er finnete, blomstene er gulhvite og samler seg i paraplylignende former. Bærene er sorte, og når de modnes på sensommeren samles de i klaser (Mumcuoglu, 1995; Atkinson & Atkinson, 2002).



Bilde 4-2. Svarthyllbær (Wikipedia, 2008).

Svarthyll er naturlig utbredt i store deler av Europa, vest i Asia og i Nord-Afrika. Treet anses nå også som naturlig forekommende i Norge, men har sannsynligvis blitt dyrket fra omkring middelalderen, da svarthyll kom til Skandavia som kulturplante. Forvillede trær kommer trolig fra gamle husmannsplasser og bosteder, eller er spredt av fugler som har spist bærene (Atkinson & Atkinson, 2002; Hjelmstad, 2008). Treet er blant annet nevnt i Norges eldste hagebok, Gartners, fra 1694. Fremstad et al (1998) har kartlagt utbredelsen av svarthyll i Norge, og funnet ut at planten befinner seg spredte steder langs kysten fra Østfold til Sør-Trøndelag. Svarthyll omtales her som en lavlandsart bundet til kulturpåvirket mark og vegetasjon. Videre skriver de at treet finnes ved overgangen mellom dyrket mark og tilgrensede arealer, i skogsbryn og sterkt kulturpåvirket skog (Fremstad & Elven, 1998).

### 4.1.3 Myter og gammel folketro

Innen gammel folketro og i mange myter har svarthylltreet vært sentral. Svarthyll var et hellig tre for sigøynere, og mye brukt for dets helende egenskaper (Tierra, 1999). Noen steder trodde man treet var knyttet til gudinnen Frøya, mens andre mente det var bolig for en vette og at det dermed var risikofylt å hugge eller kappe greiner av det. I Danmark mente man at "Hylde-Moer" (Hyllemor) bodde i treet og passet på det. Om man forsøkte å lage møbler ut av svarthylltreet ville man bli besøkt av Hyllemor. Dersom det var helt nødvendig å fjerne treet måtte Hyllemor først spørres, og ved å forholde seg stille ga hun sin tillatelse til nedhuggingen. Slik unngikk man å bli utsatt for ulykker og forferdelige hendelser. Som en konsekvens av alle myter og gamle tradisjoner ble svarthyll et symbol på sorg og død, og lenge ville ikke folk hugge treet, i frykt for å bli forfulgt av uhell (Grieve, 1931; Hjelmstad, 2007). Også religiøst har svarthylltreet satt sine spor, og flere forfattere har treet med i noen av sine verk. I tekster fra middelalderen er det hentydet at det var i et svarthylltre Judas hang seg etter å ha forrådet Jesus. Selveste Shakespare refererer i *Cymbelin* til svarthyll som et symbol på grådighet, og snakker om det som "the stinking Elder". William Sharp skriver om et gjenferd som sitter under et svarthylltre i sitt dikt "the Death Child" (Grieve, 1931; Geda, 1943).

### 4.1.4 Folkemedisinsk bruk

Svarthyll er et mye omtalt tre med et utbredt og variert bruksområde, både populært og industrielt, blant annet som hårfarge, insektsmiddel, smakstilsetning i mat og mot flere sykdommer. Størst utnyttelse har den som næringsmiddel (syltetøy, vin og leskedrikk) og innen medisin (sykdomsbehandling) (Grieve, 1931; Vallès *et al.*, 2004).

Svarthyll en enestående medisinsplante, ettersom alle delene av den utnyttes, og bruksområdene er mange og varierte. Likevel er det blomstene til svarthylltreet som har størst anvendelse innen folkemedisin. Blomstene er mye omtalt, og innholdsstoffer og bruk er beskrevet i flere farmakopeer og tradisjonelle medisinske systemer (World Health Organization, 2002; Plants for a Future, 2004). De medisinske egenskapene til svarthyllbærene er også mange. De dateres helt tilbake til 400 år før Kristus og er funnet i Hippokrates, Dioscurides og Pilnius sine skrifter (Mumcuoglu, 1995). Oftest kokes bærene, og saften benyttes, men bærene kan også tørkes og trekkes som te. Noen anvender også vin

laget av svarthyllbær som medisin (Plants for a Future, 2004). En oversikt over de vanligste anvendelse av svarthyllbær er vist i tabell 4-1.

Bruksområde	Formulering
Influenza	Saften fra bærene
Antiinflammatorisk	Saften fra bærene (sirup)
Immunstimulering	Bærekstrakt
HIV/AIDS	Bærekstrakt
Allergisk rhinitt	Bærekstrakt
Sinusitt	Bærekstrakt
Lakserende	Ukjent
Kolikk	Te av tørkede bær
Diaré	Te av tørkede bær
Revmatisme	Bærekstrakt og vin
Diuretisk	Vin
Emetisk	Vin
Kreft	Bærekstrakt

Tabell 4.1. Folkemedisinsk bruk av svarthyll (Grieve, 1931; Chevallier, 1996; Plants for a Future, 2004; Vallès et al., 2004; Natural Medicines, 2008).

#### 4.1.5 Biologisk aktivitet

##### *Aktive innholdsstoffer*

- Flavonoider: quercetin og rutin
- Antocyaniner:
  - cyanidin-3-O-sambubioside-5-O-glukosid
  - cyanidin-3-O-glukosid
  - cyanidin-3-O-sambubiosid
  - cyanidin-3,5-O-diglukosid
- Sambucus nigra agglutinin III (SNA-III)
- Cyanogeniske glykosider: sambunigrin og viburnic acid
- Vitaminer: A og C

(Monograph, 2005; Roxas & Jurenka, 2007)

Det er antas ofte at antocyaninene er ansvarlig for svarthyllbærenes immunmodulerende effekt, og muligens også den anti-inflammatoriske effekten (Natural Medicines, 2008).

### *Kliniske studier*

De antivirale egenskapene til svarthyllbær ble først undersøkt av en israelsk virolog ved navnet Madeleine Mumcuoglu. Hun viste at bærene nøytraliserte aktiviteten til hemagglutininproteiner funnet på overflaten til influensavirus A og B, og herpesvirus (Mumcuoglu, 1995). Denne hemmingen hindrer viruset å penetrere kroppens cellemembraner, og dermed vil ikke viruset kunne replikere. Det er også vist at bærene har immunmodulerende effekt, ved å forsterke cytokinproduksjonen, aktivere fagocytter og øke infiltreringen av celler til inflammasjonsstedet. Den tyske kommisjonen "German Commission E" rapporterer at innholdsstoffer i svarthyll er effektive mot symptomlettelse ved forkjølelse, feber og betennelser, men henviser ikke til studier som kan bekrefte dette (Roxas & Jurenka, 2007).

To randomiserte, placebo-kontrollerte og dobbeltblinde studier, som har demonstrert at ekstrakt av svarthyllbær gitt innen 48 timer etter symptomutvikling hemmer influensa A og B stammer, beskrives i monografien fra 2005. I den ene studien utført på 27 personer, ble forbedring av influensasyntomer ble oppnådd hos 93% av forsøkspersonene innen to dager etter initial dosering, mens 91% av personene i kontrollgruppen viste tegn til bedring etter 6 dager. Den andre studien ble utført på 60 personer med tidlige influensasyntomer, og etter 3-4 dager rapportert majoriteten i behandlingsgruppen tydelig forbedring. I kontrollgruppen tok det 7-8 dager før lik bedring var oppnådd (Monograph, 2005; Roxas & Jurenka, 2007).

På grunn av sitt innhold av antocyaniner er svarthyllbær interessant i forhold til antikarsinogen og antioksidierende effekt. Svarthyllbær har større antioksidierende kapasitet enn vitamin C og E. Ved å benytte cyclooxygenase (COX) -1 og -2, quinone reductase (QR) og ornithine decarboxylase (ODC) er ulike bærekstrakters anticancereffekt undersøkt, i en studie utført ved universitetet i Illinois i 2005. Det ble funnet bioaktivitet relevant til initierende og promoterende stadier av karsinogenese (Thole *et al.*, 2006). Flere andre sykdommer assosieres med oksidativt stress, blant annet kardiovaskulær sykdom, nevrodegenerative sykdommer, perifer vaskulær sykdom, autoimmune sykdommer og multippel sklerose. På grunn av sitt innhold av antioksidierende forbindelser kan svarthyllbærene være viktige verktøy i behandlingen av sykdommer der oksidativt stress er involvert (Monograph, 2005). Bell et al (2006) har forøvrig vist at antocyaninrike ekstrakter

av svarthyllbær ikke relakserer koronare arterier, og skriver at dette ikke kommer av konsentrasjonen av fenoliske forbindelser i ekstraktene, men av antocyanin-sammensetningen i bærene (Bell & Gochenaur, 2006).

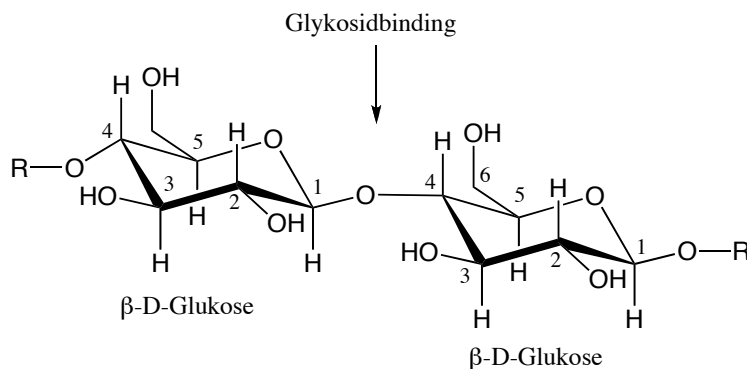
Svarthyllbær er også testet *in vitro* mot herpes simplex virus (HSV-1) der viral replikasjon ble hemmet i fire ulike stammer. I tillegg er bærene undersøkt for deres evne til å hemme smitte av humant immunsvikt virus (HIV), ved å preinkubere ekstrakter av svarthyllbær med HIV *in vitro* før celler ble tilsatt. En signifikant reduksjon i smitte ble observert. Flere kliniske studier er for øvrig nødvendig før det kan trekkes konklusjoner om svarthyllbærenes antivirale effekt (Monograph, 2005).

### ***Uheldige effekter***

Det ser ut til at svarthyll er godt tolerert, og at svært få opplever bivirkninger. Likevel er det rapportert bivirkninger ved inntak av bær, og dette tror man skyldes at umodne bær inneholder et giftig alkaloid og cyanogeniske glykosider som kan forårsake kvalme, oppkast og diaré. Det er også rapportert at inntak av umodne bær kan forårsake svakhet, svimmelhet og nummenhet. Bærene bør kokes eller tørkes for å unngå dette. Det er forøvrig ingen bekreftede legemiddelinteraksjoner med svarthyllbær (Vallès *et al.*, 2004; Monograph, 2005; Natural Medicines, 2008).

## **4.2 Polysakkarider i planter**

Karbohydrater, som også kalles sakkarider eller sukre, er organiske molekyler som produseres i alle levende organismer og brukes som energikilde. De er også bestanddeler i celleveggene til bakterier, planter og trær, og befinner seg i tillegg i bindevev hos dyr. Karbohydrater er kirale polyhydroxyaldehyder og –ketoner, som ofte eksisterer i form av sykliske hemiacetaler, og består av hydrogen, karbon og oksygen i forholdet 1:2:1. Ett karbohydratmolekyl alene kalles et monosakkarid, og flere monosakkarider kan bindes til hverandre ved hjelp av glykosidbindinger (figur 4-1). En kjede med 2-10 monosakkarider kalles oligosakkarider, og kjeder med flere enn 10 monosakkarider kalles polysakkarider (Izydorczyk, 2005b; Paulsen & Barsett, 2005).



*Figur 4-1 To monosakkarider bundet via glykosidbindinger med  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 konfigurasjon. R representerer flere monosakkarider i kjeden.*

Et polysakkarid kan bestå av samme type monosakkarid (homopolysakkarid) eller av flere ulike monosakkarider (heteropolysakkarid). Graden av polymerisering varierer, men få polysakkarider består av færre enn 100 monosakkarider, og det finnes polysakkaridkjeder med flere hundre tusen monosakkarider. Glykosidbindingene kan ha enten  $\alpha$ - eller  $\beta$ -konfigurasjon, og et monosakkarid kan binde seg til et annet monosakkarid ved flere C-posisjoner, for eksempel  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 eller  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3. I tillegg kan polysakkaridene være forgrenede eller lineære. Alt dette bidrar til å gjøre polysakkarider til en gruppe molekyler med enormt store variasjonsmuligheter. Noen polysakkarider består kun av nøytrale monosakkarider, for eksempel cellulose. Andre polysakkarider inneholder uronsyrer, som er monosakkarider med en syregruppe i C-6. Det er kun funnet ett polysakkarid med positiv ladning, kitosan (Izydorczyk, 2005). Polysakkarider deles også ofte inn i tre grupper etter molekylvekt: høymolekulære polysakkarider (HMW), intermediære polysakkarider (IMW) og lavmolekulære polysakkarider (LMW) (Shols & Voragen, 2002).

### 4.2.1 Plantecelleveggen

Plantecelleveggen er en rigid struktur som beskytter plantecellen, uten å hindre diffusjon av vann og ioner fra miljøet omkring til plasmamembranen. Celleveggen er hydratisert og gel-lignende og består av tre lag: midtlamellen, den primære celleveggen og den sekundære celleveggen, men ikke alle celletyper har sekundær cellevegg (Taiz & Zeiger, 1991; Popper, 2008). Polysakkarider er en viktig del av plantecelleveggen. Hovedkomponenten er cellulose, og planteceller er omringet av lag med cellulosefibriler som former et ikke-elastisk og uløselig krystallinsk materiale. Cellulosefibrene er forbundet med hemicellulose (xyloglukan og arabinoxylan), som er integrert i en matriks av pektiner (Vorwerk *et al.*, 2004).

### 4.2.2 Cellulose og hemicellulose

Cellulose er polysakkarider som består av opp til 15 000 glukosemolekyler bundet med  $\beta$ -1,4-bindinger. I celleveggen er disse organisert som et nettverk av cellulosemikrofibriller, og fungerer som en solid og beskyttende barriere. Hemicellulose er polysakkarider bygget opp av blant annet glukose, xylose, arabinose, mannose og galaktose. Hemicelluloser bindes til overflaten av cellulosemikrofibrillene ved hjelp av hydrogenbindinger, og fungerer også som bindende bro til pektinmolekyler (Taiz & Zeiger, 1991; Aarnes, 2000).

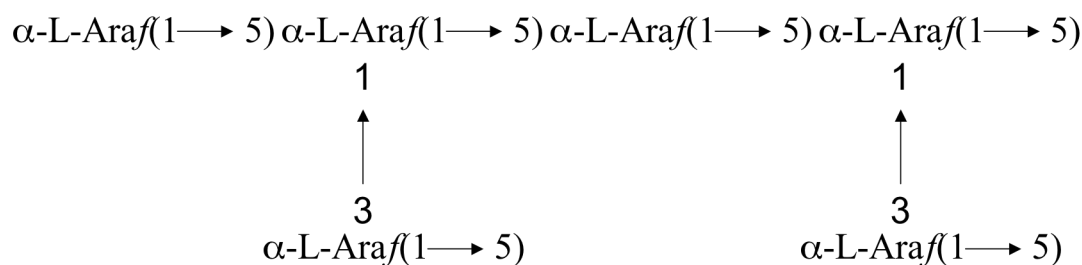
### 4.2.3 Pektintype polysakkarider

Moderne teknologi har vist at mange planter inneholder polysakkarider med diverse biologisk aktivitet, og i tillegg har polysakkaridene industriell verdi på grunn av deres viskøse egenskaper og evne til å danne geler. Det første rene polysakkaridet som ble vist å ha biologisk aktivitet ble isolert i 1984 fra *Echinacea purpurea*, en plante som lenge har vært brukt mot influensa og forkjølelse. Etter dette økte interessen for polysakkarider som biologisk aktive forbindelser. Polysakkaridene finnes i mange varianter, og på mange forskjellige steder i planten. De er tilstede i alle organer, både i og mellom celler, og er viktige forsterkende substanser. De kan enten være nøytrale eller sure, men det er likevel mange strukturelle likheter mellom de ulike typene (Paulsen & Barsett, 2005).

#### *Arabinaner*

Arabinanene funnet i planter er vanligvis sammensatt av L-arabinofuranosider der hovedkjeden er 1,5-bundet, og sidekjedene vanligvis er bundet i 3-posisjon, men også noe i 2-posisjon, se figur 4-2. Arabinanene kan være lineære eller forgrenede, avhengig av hvilken plante de er isolert fra. Hvordan arabinanene foreligger i naturen er ikke fullstendig forstått, men det er sannsynlig at de er bundet til galaktaner i pektinkomplekset, og frisettes enzymatisk eller ved svak syrehydrolyse under ekstraksjonsprosessen. Arabinaner med komplementfikserende evne er blant annet isolert fra røttene til *Bupleurum falcatum* ( $\alpha$ -2,5-arabinofuranan) og frukten fra *Ziziphus jujuba* ( $\alpha$ -3,5-arabinofuranan- $\alpha$ -1,4-glukan kompleks) (Paulsen & Barsett, 2005).





Figur 4-2 Forenklet struktur til en del av et arabinan, slik man tror den ser ut.

### Arabinogalaktaner (AG)

Arabinogalaktaner har blitt rapportert til å ha biologisk aktivitet i mange testsystemer. Disse forbindelsene deles ofte inn i tre grupper: AG-I (arabino-4-galaktaner), AG-II (arabino-3,6-galaktaner) og AG-III (polysakkarider med AG-sidekjeder). Den siste gruppen tilsvarer pektiner omtalt nedenfor. En enkel måte å skille AG-I fra AG-II er ved å benytte en fellingsreagens, Yariv reagens. Kun AG-II har evnen til å danne et rødt kompleks sammen med Yariv reagenset (Paulsen & Barsett, 2005).

#### Arabinogalaktan I

AG-I har hovedkjede av  $\beta$ -1,4-bundet galaktan, og sidekjeder av  $\alpha$ -1,5-bundet arabinan bundet via posisjon 3 i galaktoseenhetene. AG-I finnes i variabel grad i plantecellevegg, hovedsaklig i pektinkompleksets RG-I (se under) (Paulsen & Barsett, 2005).

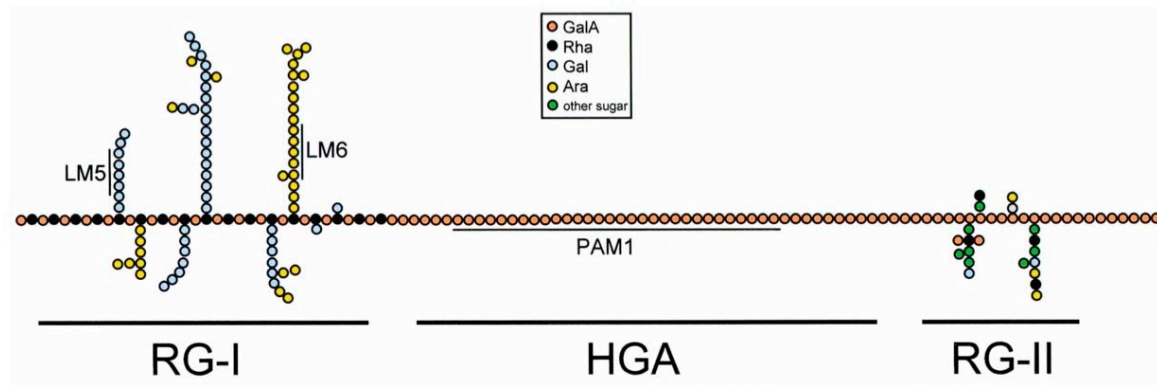
#### Arabinogalaktan II

Arabinogalaktan II er høyt forgrenede polysakkarider. Hovedkjeden består som oftest av  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- og  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-bundet galaktaner, med 1,3,6-bundet galaktose i forgreiningpunktene. (1 $\rightarrow$ 3)-bundne galaktankjeder kan være forgrenet via O-6 med arabinofuranose, og noe sjeldnere med arabinopyranose. Det kan også være lengre kjeder av 1,3- og 1,5-bundet arabinaner tilstede. Generelt inneholder AG-II mer galaktose enn arabinose, men forholdet mellom de to varierer. AG-II er mer vanlig i planter enn AG-I, og er ofte funnet bundet til RG-I i pektinkomplekset. AG-II polysakkaridene er også rapportert bundet til arabinogalaktanproteiner (Schols & Voragen, 2002; Paulsen & Barsett, 2005).

### Pektiner

Pektiner er et samlebegrep for galakturonsyre-rike sure polysakkarider. Pektintype polysakkarider finnes i primærcelevegg, men også i midtlamellen og mellom cellene der de regulerer intracellulær adhesjon. De tre viktigste pektinpolysakkaridene i planter er

homogalakturenan (HGA), rhamnogalakturenan I (RG-I) og rhamnogalakturenan II (RG-II). Disse polysakkaridene kan eksistere alene, eller sammen i ulike pektinkomplekser. Et eksempel på en generell struktur av et forenklet pektinkompleks er vist i figur 4-3 (Willats *et al.*, 2001).



Figur 4-3 Skjematisk presentasjon av en generell pektinstruktur (Willats *et al.*, 2001)

### Homogalakturenan

HGA er lineære homopolymerer av (1→4)- $\alpha$ -D-galakturensyre-enheter, og lange sekvenser av homogalakturenaner kan finnes i pektiner, såkalte "glatte regioner" i pektinkomplekset. HGA-kjeden kan være esterifisert med metylgrupper, og i noen tilfeller kan de også være O-acetylt, hovedsaklig i 3-posisjon. Galakturensyreenhetene i HGA-kjeder kan være substituert med xylose i posisjon 3, og domene kalles da xylogalakturenan (XGA) (Willats *et al.*, 2001).

### Rhamnogalakturenan I

Vanligvis er RG-I det mest utbredte pektinet, og består av en hovedkjede med alternerende  $\alpha$ -1,2-L-rhamnose og  $\alpha$ -1,4-bundet D-galakturensyre. (Vorwerk *et al.*, 2004)

Rhamnoseenhetene i den alternerende stammen er forgreiningspunkter, der varierende sidekjeder av galaktan og arabinan er bundet i 4-posisjon og i noen tilfeller i 3-posisjon. Arabinogalakktanene som er bundet til RG-I er oftest av typen AG-II, men kan også forekomme som AG-I. Denne regionen med RG-I bundet til ulike sidekjeder med arabinogalakktaner kalles ofte "hårete region" av pektinkomplekset (Paulsen & Barsett, 2005).

## Rhamnogalakturonan II

RG-II er en kompleks struktur som ser ut til å være tilstede i primærcelleveggen hos de fleste planter. Det er en del av pektinkomplekset, men utgjør kun en liten del av den totale mengden pektin tilstede i planter. RG-II har homogalakturonan hovedkjede bestående av 9-10 D-galakturonsyre-enheter som er  $\alpha$ -1,4-bundet, og ikke rhamnose selv om navnet tilsier dette. Hovedkjeden har fire ulike oligosakkaridkjeder bundet via posisjon 3 eller 4, og i disse er det funnet sjeldne monosakkarid-enheter som for eksempel 2-O-metylfucose, 2-O-metylxylose og apiose. 29 forskjellige planter er rapportert frem til 2003 til å ha RG-II med mer eller mindre lik struktur, noe som tyder på at dette er en bevart struktur (Paulsen & Barsett, 2005).

## Struktur og biologisk aktivitet

Ikke alle pektintype polysakkarider er biologisk aktive, og dermed må det være visse strukturelle momenter som er viktig for aktivitet. De fleste polysakkaridene som har vist seg å ha biologisk effekt påvirker immunsystemet på et eller annet vis. I tillegg er også noen andre effekter observert, blant annet antitumoraktivitet, sårheling, mitogen aktivitet og makrofagaktivering. Strukturer i disse polysakkaridene er undersøkt, og det er observert at de fleste inneholder RG-I hovedkjede, og de fleste av disse har AG-II sidekjeder. Det er i tillegg funnet rene AG-II og RG-II strukturer (Paulsen & Barsett, 2005).

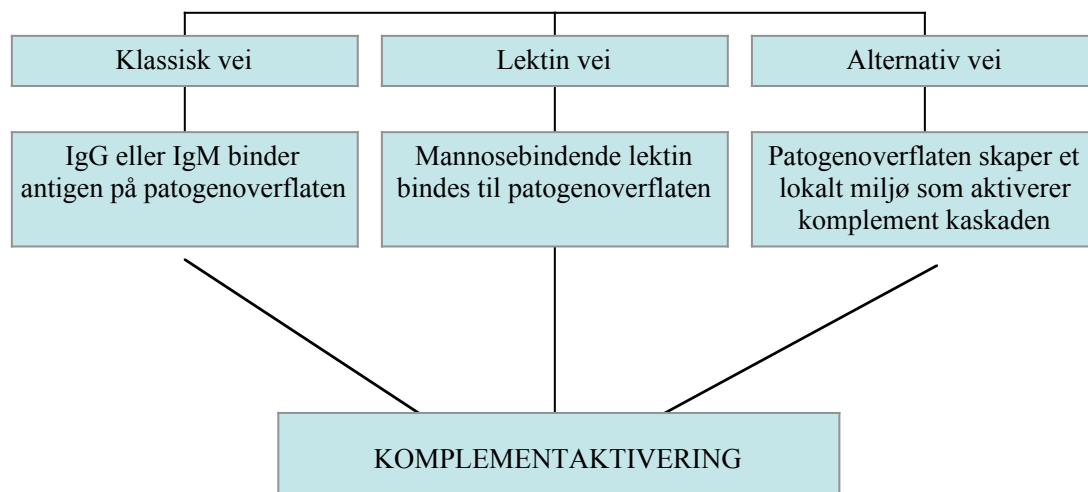
Mitogen effekt er assosiert med hårete regioner (RG-I), og man tror nøytrale karbohydrat-sidekjeder bidrar til aktiviteten (Yamada & Kiyohara, 2007). AG-I-rike pektinfraksjoner fra *Angelica acutiloba* har vist seg å ha potent antitumoraktivitet, og dermed ser det ut til at 4-bundet galaktoseenheter som finnes i AG-I er viktige for denne aktiviteten. En polysakkaridfraksjon som inneholdt pektin type polymerer fra *Bupleurum falcatum*, Bupleuran 2IIc, er vist å ha sårhelende og komplementfikserende effekt. Strukturer som AG-II, RG-I og RG-II ser ut til å være ansvarlig for disse effektene (Paulsen & Barsett, 2005).

Den hårete regionen (RG-I) ser ut til å være den viktigste strukturelle enheter for effekt på komplementsystemet. Det er også blitt foreslått at arabinogalaktan-II med 1,3 og 1,6 galaktosekjeder med forgreiningspunkter av typen 1,3,6 er de aktive setene for komplementfiksering for pektiner fra *Angelica acutiloba*, *Glinus oppositifolius*, *Glycyrrhiza uralensis* og *Vernonia kotschyana*. AG-II strukturene er forøvrig funnet i de fleste polysakkarider med effekt på komplementsystemet, men det finnes unntak. AG-II fra *Larix*

*occidentalis* feller ikke ut med Yariv reagens, og den viser heller ikke biologisk aktivitet mot komplement. Dermed er det foreslått at flere faktorer kan være viktig for komplementfikserende evne, blant annet AG-IIs størrelse og plassering på polymeren, eller at det må være flere enn ett bindingssete. I tillegg til dette er både AG-I og RG-II også funnet å være involvert i komplementfiksering, men ikke i like stor grad. RG-II fra *Panax ginseng* er mye studert, og denne ser forøvrig ut til å være biologisk aktiv kun som dimer. Hvorvidt dette gjelder RG-II fra andre planter er ikke kjent (Paulsen & Barsett, 2005).

#### 4.2.4 Komplementsystemet

Komplementsystemet er essensielt for medfødt og adaptiv bekjempelse av infeksjoner, og består av over 20 serumproteiner, hvorav 9 er såkalte komplementkomponenter og resten er deres regulatorer. Normalt er disse proteinene tilstede i en inaktiv form. Aktiveringen kan skje via tre ulike komplement-aktiveringsveier; klassisk vei, alternativ vei og antistoff-uavhengig lektinvei (Yamada & Kiyohara, 1999) (Figur 4-4). Den klassiske veien aktiveres ved at antistoffer av typen IgM eller IgG bindes til mikrobielle overflater. For at lektinveien skal aktiveres må mannose-bindende lektin fra plasma binde karbohydrater på bakterieceller. Den alternative veien aktiveres ved direkte påvirkning av det lokale fysiokjemiske miljøet som dannes på grunn av visse overflatebestanddeler på enkelte bakterier.



Figur 4-4 Aktivering av komplementsystemet.

Aktivering av komplementsystemet initierer en aktiveringskaskade som resulterer i rekruttering av betennelsesceller, opsonisering og fagocytose av patogener, og perforering av patogencelle-membran. Alle disse hendelsene fører til at patogenen dør (Praham, 2005).

Stoffer som kan påvirke komplementsystemet på en eller annen måte vil være interessante i forbindelse med en mulig immunstimulerende/aktiverende effekt. Ulike forbindelsers påvirkning på komplementsystemet kan måles i et testsystem, der en prøve inkuberes med komplement og deretter tilsettes sensibiliserte blodceller fra sau. Komplement har evnen til å hemolysere de sensibiliserte blodcellene, og dersom prøven interfererer med komplement vil graden av hemolyse endres. Ulike forbindelsers evne til å interferere med komplement på denne måten kalles av Yamada og Kiyohara den ”antikomplementære effekten” (Yamada & Kiyohara, 1999). I testsystemet skilles det ikke mellom aktivering eller hemming av komplementsystemet. Ved komplementaktivering vil komplement brukes opp, og ved komplementhemming vil prøven binde komplement slik at det ikke virker. I begge tilfeller vil grad av hemolyse gå ned, og resultatene vil derfor kun gi en indikasjon på komplementpåvirkning (komplementfiksering). Begrepet ”komplementfikserende evne” er dermed mer dekkende enn ”antikomplementær effekt”, og vil benyttes videre i oppgaven.

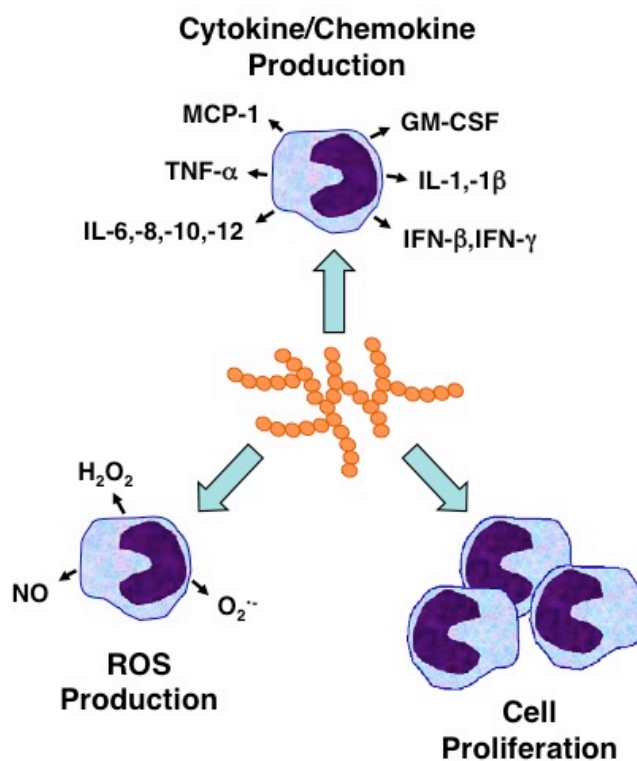
Endel polysakkarider fra planter, sopp og bakterier er allerede isolert og testet for komplementfikserende evne, og flere har også vist seg å være anti-inflammatoriske. Antikomplementære pektiner er isolert fra medisinske urter som *Angelica acutiloba*, *Bupleurum falcatum*, *Panax ginseng* og *Plantago major*. Det er også funnet antikomplementære arabinogalaktaner fra medisinske urter, oftest av typen arabinogalaktaner. Andre polysakkarider med komplementfikserende evne kan for eksempel være arabinaner og heteroglukaner (Yamada & Kiyohara, 2007). PMII er et pektintype polysakkarid med arabinogalaktan, isolert fra bladene til *Plantago Major* L. Polysakkaridet har komplementfikserende aktivitet, og benyttes ofte som sammenligningsgrunnlag når nye polysakkarider skal testes for dette (Yamada & Kiyohara, 1999).

#### 4.2.5 Makrofager

Monocytt er spesialiserte hvite blodceller utviklet fra hematopoetiske stamceller i beinmargen. Monocytene sirkulerer i blodbanen, og kan videre differensieres til makrofager i vev. Makrofager kalles fagocytter, ettersom de tar opp og prosesserer fremmed materiale,

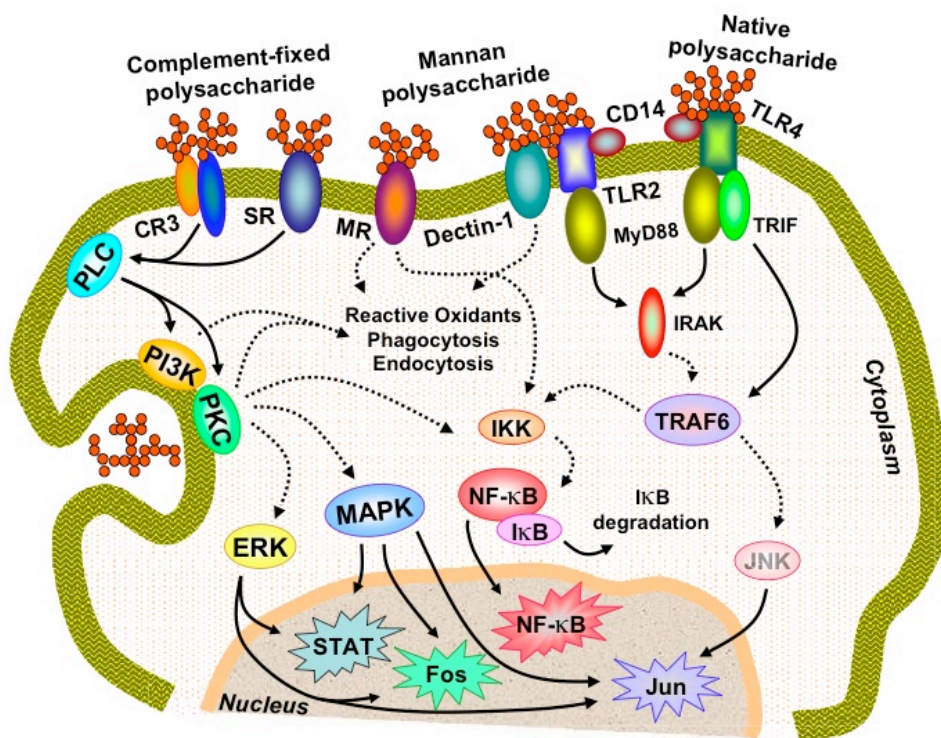
for eksempel mikroorganismer. Makrofager utgjør derfor en viktig del av kroppens immunforsvar mot inntrengere (Praham, 2005).

Makrofager har flere antimikrobe-funksjoner, inkludert overvåkning, kjemotakse og destruksjon av utpekte organismer (figur 4-5) (Schepetkin & Quinn, 2006). Aktiverte makrofager frisetter mange betennelsescytokiner med biologisk aktivitet. Nitrogenoksid (NO) og tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) er viktige effektormolekyler ved makrofagaktivering, og disse spiller en viktig rolle i kroppen førstelinjeforsvar mot blant annet tumorceller og bakterieinfeksjoner. Makrofager har flere reseptorer på sin overflate som gjenkjenner karbohydrater og andre forbindelser som ikke er tilstede i humane celler. Disse reseptorene inkluderer mannosereseptor, scavengerreseptor, komplementreseptor og flere Toll-likereseptorer (TLRs) (Praham, 2005). TLRs er viktige for gjenkjennelse og respons på infeksiose mikrober, og uttrykkes på mange av kroppens celler. Makrofager uttrykker TLR4, som er et medlem av denne reseptorfamilien. Blant annet gjennom denne reseptoren aktiveres makrofagene og NO og TNF- $\alpha$  sekreteres. TLR4 er også kjent som lipopolysakkaridreseptor (LPS-R) som er funnet på en rekke bakterier (Yang *et al.*, 2007).



Figur 4-5 Ulike makrofagresponser (Schepetkin & Quinn, 2006).

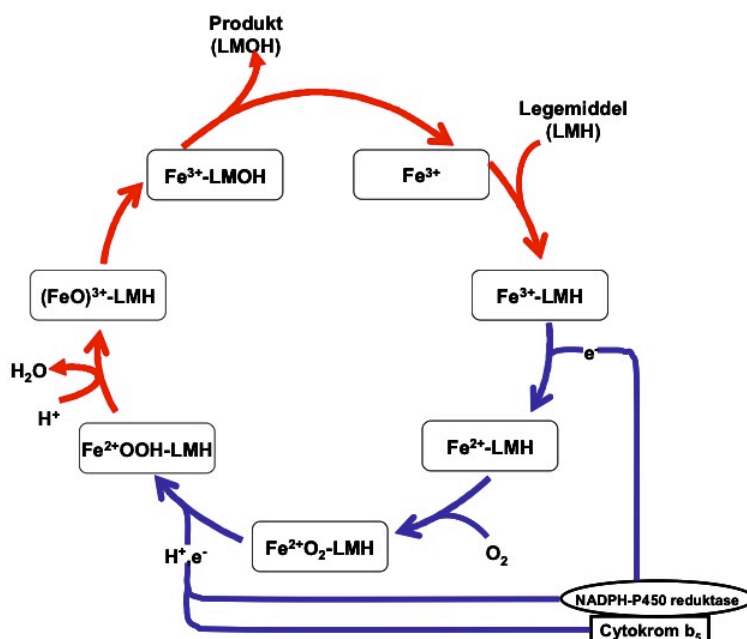
Flere studier på polysakkarider fra planter har vist at disse kan øke makrofagenes cytotoxicitet mot tumorceller og mikroorganismer, aktivere fagocytose, øke produksjonen av reaktive oksygen radikaler (ROS) og nitrogenoksid (NO), og forsterke sekresjon av cytokiner og kjemokiner. Faktisk har polysakkarider fra hele 35 plantearter i 22 ulike familier vist makrofagaktiverende effekt (Schepetkin & Quinn, 2006). Det er flere teorier på hvordan polysakkaridene fører til makrofagaktivering, men man tror det innebærer at gjenkjennelse av polysakkaridene, på blant annet TLR4, komplementreseptor 3 (CR3), scavengerreseptor og mannosereseptorene på makrofagene, figur 4-6 (Schepetkin & Quinn, 2006). Nylig er også flere immunstimulerende polysakkarider isolert fra bakterier, og effekten kan assosieres med aktivering av TLR4 i makrofager, T-celler og B-celler. Dette tyder på at noen polysakkarider kan trigge TLR4 og dermed aktivere det medfødte immunsystemet. Mange mener nå at den forsterkende påvirkning polysakkarider fra planter har på immunsystemet åpner for muligheten til å hindre invasjon av mikroorganismer og tumorvekst uten å skade verten (Yang *et al.*, 2007).



Figur 4-6 Skjematisk modell som viser de komplekse potensielle signaleringsveiene involvert i makrofagaktivering av polysakkarider.

### 4.2.6 Cytokrom p450 systemet

Cytokrom P450 er en hemoprotein-superfamilie av enzymer som står for oksidativ metabolisme av xenobiotika og endogene forbindelser. Målet er å gjøre forbindelsene mer hydrofile, slik at retensjonen reduseres og utskillelsen fra galle og nyrer øker (Johnson, 2008). Enzymene er lokalisert i cellenes endoplasmatiske retikulum i de fleste vev, med høyest konsentrasjon i lever og tarmvegg. Hittil er rundt 60 humane CYP-enzymet beskrevet. Noen av CYP-enzymene har viktige fysiologiske funksjoner, for eksempel CYP3A4, CYP2D6 og CYP2C9, mens andre virker beskyttende ved at de omdanner potensielt skadelige fremmedstoffer. CYP-enzymene er involvert i metabolismen til over 50 % av alle legemidler, og er derfor de viktigste enzymene i kroppens legemiddelomsetning (Molden, 2006). Figur 4-7 viser CYP-enzymenes katalytiske omsetning, her illustrert med omdannelsen av et legemiddel (LMH), der LMH bindes til heme-gruppen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) på CYP. En konformasjonsendring av CYP-enzymet gir en ønsket elektronoverføring fra NADPH via NADPH-P450-reduktase til  $\text{Fe}^{3+}$ -LMH-komplekset, og  $\text{Fe}^{3+}$  reduseres til  $\text{Fe}^{2+}$ . Molekylært  $\text{O}_2$  binder seg til det reduserte komplekset. Dette komplekset dekomponerer til  $\text{H}_2\text{O}$  og  $(\text{FeO})^{3+}$ -LMH, på grunn av en ny elektronoverføring fra NADPH-P450-reduktase eller cytokrom b<sub>5</sub> i tillegg til overføring av to protoner. Legemidlet hydroksyleres (LMOH), og CYP-enzymet regenereres (Postvoll, 2006).



Figur 4-7 CYP-enzymenes katalytiske omsetning av et legemiddel.



---

Begrepet P450 ble introdusert i 1958 av Garfinkel og Klingenberg, da de oppdaget et karakteristisk absorpsjonsmaksimum (peak) på 450 nm når levermikrosomer ble eksponert for karbonmonoksid. Navnet cytokrom kommer av cyto (celle) og krom (farge), og ble benyttet på grunn av pigmentegenskapene til heme-delen ( $\text{Fe}^{2/3+}$ ) i enzymene. Utviklingen av metoder for å analysere gensekvenser, førte til økt forståelse av CYP450-systemet og navngiving av enzymene i 1980-årene. Mange CYP-gener ble identifisert, og et system for klassifisering og nomenklatur ble introdusert. Systemet baseres på slektskap og overlapping i gensekvenser mellom de ulike CYP-genene, og betegnelsen CYP er grunnsymbolet. Enzymer med over 40% gensekvens-overlapping plasseres i samme familie, og dette vises med et tall (CYP3). Dersom det er 55-70% overlapping havner enzymene i samme underfamilie, som betegnes med en stor bokstav (CYP3A), og et siste tall angir det enkelte enzymet (CYP3A4) (Molden, 2006).

CYP-enzymenes aktivitet kan hemmes (redusert metabolisme) eller induseres (økt metabolisme) under påvirkning av ulike miljøfaktorer, for eksempel ved samtidig bruk av legemidler, næringsmidler eller rusmidler. Hemming og induksjon av CYP-metabolisme er trolig de hyppigste årsakene til klinisk viktige legemiddelinteraksjoner, og det er derfor nyttig å kartlegge ulike forbindelsers påvirkning på CYP-enzymmer (Molden, 2006).

## 5. Oppgavens mål

Målet med denne oppgaven er tredelt:

1. Ekstraksjon av bær fra *Sambucus nigra*, og isolere ulike polysakkaridfraksjoner på grunnlag av molekylstørrelse og ladning.
2. Biologisk karakterisering av de ulike fraksjonene.
3. Karakterisering av fraksjonenes karbohydratsammensetning og bindingsforhold.

## **6. Metoder**

### **6.1 Generelle metoder**

#### **6.1.1 Vannkvalitet**

Hvis ikke annet er nevnt, er det er kun benyttet vann destillert med Elix Millipore Progard® 2 w/o polyphenol. Før metodene for gelfiltrering og ionebytterkromatografi er det rensede vannet i tillegg degasset ved hjelp av heliumgass.

#### **6.1.2 Innveiging av stoff**

Alle prøver ble innveid i veieskip av plast på Satorius BP 221S analysevekt.

#### **6.1.3 Volumreduksjon**

Oppkonsentrering av løsninger ble ved behov utført ved hjelp av fordamping på Buchi rotavapor med vannbad. Vakuum ble dannet av vannstrålepumpe eller Ilmvac GmbH vakuumpumpe.

#### **6.1.4 Filtrering**

Ved filtrering av ekstraktene før gelfiltrering og ionebytterkromatografi ble det benyttet 2 ulike filtreringsmetoder:

- Filtrering med vannsug og Whatman glass mikrofiber filter 110/150mm Ø
- Filtrering med Plastipak engangssprøyte (5ml) koblet enten til Arco 50A Filter Device med 5 µm Versapor Membran eller Millex GP Filter Unit 0,22µm

### 6.1.5 Syrevasking av glassutstyr

#### *Prinsipp*

Glassutstyr kan inneholde spor av cellulose fra papp og papir fra lagringsprosessen. For å unngå at disse forurensingene påvirker karbohydratanalysen, spaltes de ved å benytte konsentrert saltsyre og skylles vekk med vann.

#### *Utstyr*

Begerglass (5L)

Briller og hansker

Varmeskap Heraeus Instruments Fraction Line UT6

#### *Prosedyre*

- A. Glassutstyret ble fylt med/dekket av konsentrert saltsyre i begerglasset
- B. Etter 30 minutter ble glassutstyret skylt godt i springvann, så i destillert vann
- C. Glassutstyret ble tilslutt tørket i varmeskap ved 80 °C

### 6.1.6 Frysetørking

#### *Prinsipp*

For å kunne oppbevare polysakkarider som tørrstoff til senere forsøk og for å kontrollere konsentrasjonen av de forskjellige isolerte fraksjonene, ble et bestemt antall ml av hver fraksjon frysetørket under vakuum underveis. Alt av ionebytterfraksjoner ble, etter å ha utført siste trinn i fraksjoneringsprosessen, frysetørket og oppbevart.

#### *Utstyr*

Rundkolber

Frysetørker: Christ Loc-1m 100401

Vakuumpumpe: Trivac D4B

Metanolbad: Hetofrig

## Prosedyre

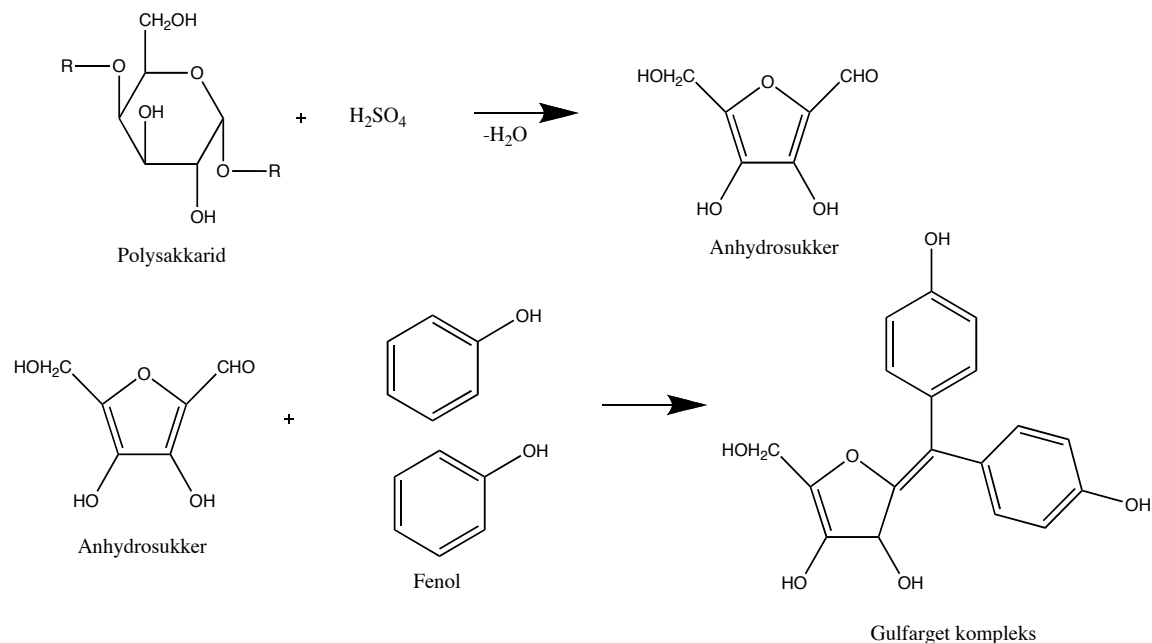
- Prøveløsningene ble overført til tarerte rundkolber og fryst ned på metanolbad ( $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) under rotasjon
- De nedfryste prøvene ble frysetørket i løpet av 1-2 dager
- Konsentrasjonsberegninger ble utført og tørrstoff ble tatt vare på

### 6.1.7 Fenol-svovelsyretest

(Dubois *et al.*, 1956; Sagberg, 2006)

#### Prinsipp

Metoden ble benyttet for å teste karbohydratinnhold i løsninger. Glykosidbindinger hydrolyseres ved hjelp av konsentrert svovelsyre, og av monosakkaridene dannes furfuraldehyder (anhydrosukker). Disse forbindelsene kondenserer med fenol, og det dannes gulfargede komplekser, se figur 6-1. Styrken på gulfargen vil, ved konstante fenolkonsentrasjoner, være proporsjonal med karbohydratkonsentrasjonen. Kompleksene absorberer UV-lys ved 490 nm, og dette kan detekteres slik at man får informasjon om karbohydratinnholdet. Eventuelt kan man lage en karbohydratprofil av en kolonneeluering.



Figur 6-1 Et polysakkarid reagerer med svovelsyre og fenol, og det dannes et gulfarget kompleks.

## ***Reagenser***

4 % fenol

Konsentrert svovelsyre, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## ***Utstyr***

Reagensrør av glass (10ml)

Finnpipette® 40-200 µl

Syreresistent pipette Gilson mircoman M250

Whirlmixer™ Fisons WM/250/SCP/2

Nunc-Immuno™ Plate, MaxiSorp™ Surface (NUNC™)

BIO-RAD Modell 3550 Microplate Reader

## ***Prosedyre***

- A. 100 µl av hver prøve ble overført til reagensrørene
- B. 200 µl fenol og 1 ml svovelsyre ble tilsatt reagensrørene
- C. Blandingen ble mikset på whirlmikser
- D. 100 µl fra hvert rør ble overført til en mikrotiterplate
- E. UV absorbans ble avlest ved 490 nm

## **6.1.8 Dialyse**

(Spectrum Laboratories Inc, 2008)

## ***Prinsipp***

Dialyse er en enkel prosess der lavmolekylære forbindelser diffunderer over en semipermeabel membran, fra en løsning med høy konsentrasjon til en løsning med lav konsentrasjon. Når likevekt oppnås stopper diffunderingen. For at ny likevekt skal innstilles, må det byttes dialysevann flere ganger i løpet av prosessen.

## ***Utstyr***

Dialyseslanger Spectra/Pro 3, MWCO 3.500 Da, d:29mm

Bøtte (10 L)

Dialyseklemmer

Magnetrører RCT Basic Kika Labortechnik (Heigar)

Glasstaver

### *Prosedyre*

- A. Dialyseslangene ble klippet til ønsket lengde og deretter skylt utenpå og inni med destillert vann
- B. Dialyseslangene ble kokt i en 2% NaOH-løsning i 10 minutter
- C. Slangene ble skylt godt med destillert vann utenpå og inni
- D. Videre ble dialyseslangene kokt i destillert vann i 10 minutter
- E. Slangene ble skylt godt med destillert vann utenpå og inni, og klare for bruk eller oppbevaring (punkt F)
- F. For å hindre bakterievekst ble slangene oppbevart ved 4 °C i en 0,05 % natriumazidløsning frem til de skulle brukes
- G. Etter oppbevaring ble dialyseslangene ble vasket med destillert vann utenpå og inni, og deretter lagt i destillert vann i 30 minutter
- H. Slangene ble knyttet i en ende, og prøvene ble overført til dialyseslangen. Den andre enden ble knytt igjen og festet med klype
- I. Slangene ble lagt i en bølge med destillert vann
- J. Bølgen ble satt på magnetrører, og prøvene ble dialysert ved 4 °C
- K. Dialysevann ble skiftet 3-4 ganger i løpet av ca 2 døgn
- L. Ved dialysering av prøveløsninger etter ionebytterkromatografi, ble det dialysert inntil dialysevannet ikke lenger ble blakket ved tilsetning av 2 dråper mettet AgNO<sub>3</sub> løsning til 2 ml dialysevann

## 6.2 Ekstraksjon av svarthyllbær

Cellevegg-polysakkarider ekstraheres fra plantecelleveggen ved å benytte ulike ekstraksjonsbetingelser. Diklormetan ekstraherer ut de mest upolare substansene og avfetter materialet. Ved ekstraksjon med 96% etanol vil lavmolekylære fenoler og karbohydrater ekstraheres ut. 50% etanol ekstraksjon vil trekke ut noe mer polare substanser, blant annet pektintype polysakkarider ofte med relativt lav molekylvekt. Sure og nøytrale polysakkarider som sitter løst i primærcelleveggen og midtlamellen vil kunne ekstraheres ut ved å benytte destillert vann ved forskjellige temperaturer (Izydorczyk, 2005).

### 6.2.1 Ekstraksjon med diklormetan

#### *Utstyr*

Morter og pistill

Trakt med glass mikrofiberfilter

#### *Prosedyre*

- A. 500 g tørkede svarthyllbær ble knust i morter, og overført til et begerglass (5L)
- B. 1,5 liter diklormetan ble tilsatt
- C. Aluminiumsfolie ble lagt over
- D. Blandingen ble satt til henstand i 24 timer
- E. Supernatanten ble filtrert av med trakt og glass mikrofiberfilter (metode 6.1.4)
- F. Trinn 2-5 ble gjentatt 2 ganger (til sammen 4,5 liter diklormetan)
- G. Bærmaterialet ble lagt utover folie i avtrekk i 24 timer
- H. Det tørkede bærmaterialet ble revet i morter

### 6.2.2 Ekstraksjon med 96 % etanol (1)

#### *Prosedyre*

- A. Bærmaterialet fra diklormetanekestaksjonen (metode 6.2.1), ble overført til et begerglass (5L)
- B. 1 liter 96% etanol ble tilsatt og begerglasset ble dekket til med aluminiumsfolie
- C. Blandingen ble satt til henstand i 24 timer
- D. Supernatanten ble dekantert av
- E. Bærmaterialet ble lagt utover aluminiumsfolie i avtrekk i 48 timer
- F. Tørket bærmateriale ble pulverisert med en kvern av typen Brabender Duisburg DII F



### 6.2.3 Ekstraksjon med 96% etanol (2)

#### *Utstyr*

Soxhlet

Soxhletfilter

Rundkolbe (2 L)

Tilbakekjøler

Varmemantel BI Barnstead Electrothermal

#### *Prosedyre*

- A. Pulverisert droge fra 96 % etanolekstraksjon 1 (metode 6.2.2) ble fordelt på to omtrent like store mengder.
- B. Den ene mengden ble overført til et soxhletfilter
- C. Ca 1 liter 96% etanol ble overført til rundkolben og rundkolben ble satt i varmemantel
- D. Drogen ble ekstrahert til ekstraktet var fargeløst
- E. Trinn B-D ble gjentatt for den andre mengden
- F. Drogerestene ble lagt utover aluminiumsfolie, og tørket i avtrekk i 24 timer

### 6.2.4 Ekstraksjon med 50 % etanol

#### *Utstyr*

Rundkolbe (2 L)

Tilbakekjøler

Varmemantel BI Barnstead Electrothermal

Sentrifuge Heraeus Multifuge 4KR

#### *Prosedyre*

- A. Drogerester fra 96% etanolekstraksjon 2 (metode 6.2.3) ble fordelt på to omtrent like store mengder
- B. Den ene mengden ble overført til rundkolben
- C. 1 liter 50% etanol ble overført til rundkolben og rundkolben ble satt i varmemantel
- D. Drogerestene ble ekstrahert i en time

E. Sentrifugering

- a. Ekstraktet ble overført 4 sentrifugebeholdere (1000 ml)
- b. Sentrifugering ved 4000 rpm i 20 minutter ved 8 °C
- c. Supernatanten ble dekantert av og tatt vare på
- d. Drogerestene ble overført tilbake til rundkolben

F. Trinn C-E ble gjentatt til etanolen var fargeløs

G. Trinn B-F ble gjentatt for den andre mengden drogerester

### 6.2.5 Ekstraksjon med 50 °C vann

#### *Utstyr*

Begerglass (5 L)

Kokeplate med magnetrører

Magnet

Termometer

Sentrifuge Heraeus Multifuge 4KR

#### *Prosedyre*

A. Drogerestene fra 50 % etanolekstraksjonen (metode 6.2.4) ble overført til et begerglass

B. 2 liter destillert vann ble overført til begerglasset

C. Drogerestene ble ekstrahert ved 50 °C på magnetrøring i en time (med temperaturkontroll)

D. Sentrifugering

- a. Ekstraktet ble overført 4 sentrifugebeholdere (1000 ml)
- b. Sentrifugering ved 4000 rpm i 20 minutter ved 8 °C
- c. Supernatanten ble dekantert av og tatt vare på
- d. Drogerestene ble overført tilbake til begerglasset

E. Trinn B-D ble gjentatt

## 6.2.6 Ekstraksjon med 100 °C vann

### *Utstyr*

Rundkolbe (2 L)

Tilbakeløpskjøler

Varmemantel BI Barnstead Electrothermal

Sentrifuge Heraeus Multifuge 4KR

### *Prosedyre*

- A. Drogerester fra 50 °C vannekstraksjonen (metode 6.2.5) ble overført til en rundkolbe
- B. Rundkolben ble satt på varmemantel og koblet til tilbakeløpskjøler
- C. 1 liter destillert vann ble tilsatt
- D. Drogerestene ble ekstrahert i en time ved 100 °C
- E. Sentrifugering
  - a. Ekstraktet ble overført 4 sentrifugebeholdere (1000 ml)
  - b. Sentrifugering ved 4000 rpm i 20 minutter ved 8 °C
  - c. Supernatanten ble dekantert av og tatt vare på
  - d. Drogerestene ble overført tilbake til rundkolben
- F. Trinn C-E ble gjentatt 2 ganger

## 6.3 Opprensing og isolering av polysakkarider

### 6.3.1 Adsorpsjonskromatografi med Amberlite XAD-7HP

(Sirnes, 2003)

### *Prinsipp*

Polymeriske adsorbenter er porøse resiner med en indre kjerne, som kan adsorbere og desorbere en rekke forbindelser avhengig av miljøet (Advanced Biosciences, 2008).

Amberlite XAD-7 er et middels polart akrylester resin, som kan adsorbere molekyler med molekylvekt opp til 60 000, og dermed benyttes i adsorpsjonskromatografi (Sigma-Aldrich, 2007). Resinet fungerer som en fast stasjonærfase, og mobilfasen er en væske.

Metoden baseres på at ulike forbindelser i en prøve har forskjellig affinitet til stasjonærfasen. De forbindelsene som har lavest affinitet elueres raskere gjennom kolonnen enn de med høyere affinitet, og dermed separeres de (Sirnes, 2003). Tre parametere påvirker bindingskapasiteten til et resin for et bestemt materiale; dipolaritet, porestørrelse og overflateareal. Materialet som skal adsorberes må kunne migrere gjennom porene til den adsorberende overflaten, og bindingen til adsorbenten må være reversibel (Sigma-Aldrich, 1998). Det ble benyttet destillert vann som mobilfase for å eluere ut polysakkaridene i 50 % etanolekstraktet. Upolare og hydrofobe forbindelser vil adsorberes til stasjonærfasen, og kan vaskes vekk etterpå med metanol, eventuelt metanol tilsatt trifluoreddiksyre (TFA).

### *Prøver (se figur 3-1)*

50%RÅ (21,4 mg/ml)

### *Spesifikasjoner*

Pakkemateriale: Sigma XAD 7

Cas.nr: 37380-43-1

Partikkelstørrelse: 20-60 mesh, våt

Batch: 066K0696

Kolonne: BioRad

Kolonnevolum: 100 ml

Mengde ekstrakt: 25 ml (40 mg/ml), filtrert med GFA filter

Fraksjonsstørrelse: 10 ml

### *Utstyr*

Begerglass (500 ml)

Pasteurpipette med ballong

Sentrifugerør RB, 14 ml (Heger AS)

## *Prosedyre*

### **Tørrpakking av kolonne**

- A. 100 g tørt kolonnematerialet ble overført til begerglass og tilsatt ca 200 ml metanol
- B. Blandingen ble overført til kolonnen under omrøring med glasstav
- C. Etter at kolonnematerialet hadde pakke seg sammen ble metanolen tappet av
- D. Trinn B-C ble gjentatt til 80-90% av kolonnen var dekket av pakket kolonnemateriale
- E. Kolonnematerialet ble vasket med 500 ml destillert vann

### **Eluering**

- A. Det ble beholdt en vannhøyde på ca 0,5 cm over pakkematerialet
- B. 25 ml prøven applisert på med pasteurpipette
- C. Kolonnen ble innstilt på sakte drypp ned i de første reagensrørene til prøveløsningen hadde nådd overflaten av pakkematerialet
- D. Under elueringen ble det kontinuerlig fylt forsiktig på med destillert vann, slik at pakkematerialet ikke virvlet for mye
- E. Kolonnen ble satt på maks drypp under elueringen
- F. Det ble samlet opp 48 fraksjoner
- G. Fraksjonene ble testet for karbohydratinnhold med fenolssvovelsyretest, metode 6.1.7.
- H. Det ble vasket med destillert vann til fargeløs løsning
- I. Det ble eluert med metanol til fargeløs løsning
- J. Det ble eluert med 0,1% TFA i metanol til fargeløs løsning (minst 200 ml)
- K. Det ble eluert med aceton:vann (70:30) til fargeløs løsning (minst 200 ml)
- L. Det ble vasket med 200 ml metanol
- M. Det ble vasket med 300 ml destillert vann

### **6.3.2 Gelfiltrering med Bio-Gel® P-6 Polyacrylamide Gel**

(Bio-Rad Laboratories, 2000)

#### *Prinsipp*

Gelfiltrering baseres på separasjon etter molekylstørrelse. Bio-Gel® P-6 gelen består av polyacrylamidpartikler som er hydrofile og ladningsfrie. Prøveløsninger elueres gjennom gelen (stasjonærfasen) med en mobilfase, og separeres på grunn av ulik størrelse (Bio-Rad Laboratories, 2000; Greibrokk *et al.*, 2005).

Gelen har porer med definert porestørrelse, og dermed et bestemt fraksjoneringsområde, som for Bio-Gel® P-6 er 1000-6000 Da (Bio-Rad Laboratories, 2000). Forbindelser med molekylvekt  $> 6000$  vil gå utenom porene og føres direkte ut med mobilfasen, og vil derfor ikke bli separert. Forbindelser med molekylvekt  $< 1000$  vil alle gå gjennom porene, og heller ikke disse vil bli separert. Forbindelser med molekylstørrelse som ligger innenfor fraksjoneringsområdet vil avhengig av størrelse og diffusjonsevne elueres ut til ulik tid, de største først og de minste til slutt (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2004). I tillegg til å benytte denne metoden for å separere polysakkarider etter størrelse, vil samtidig eventuelle lavmolekylære forbindelser og forurensninger kunne fjernes.

### ***Prøver (se figur 3-1)***

50%AMB (20,0 mg/ml)

50vRÅ (12,2 mg/ml)

100vRÅ (12,6 mg/ml)

### ***Standarder***

Standardløsning:

25 mg dextran ( $M_w = 500\,000$ )

50 mg raffinose ( $M_w = 594,5$ )

100 ml destillert vann

### ***Spesifikasjoner for metoden***

Pakkemateriale: Bio-Gel® P-6 DG Bio-Rad

Partikkelstørrelse: 90-180  $\mu\text{m}$  (wet)

Fraksjoneringsområde: 1000 - 6000 daltons

Cas.nr: 25034-58-6

Batch: L1500739

Kolonne: XK50 (Pharmacia Biotech)

Kolonnevolum: 967 ml

Mengde ekstrakt: 100 ml filtrert med sprøyte med 5  $\mu\text{m}$  filter eller 0,22  $\mu\text{m}$  filter

Elueringshastighet: 1 ml/min

Fraksjonsstørrelse: 10 ml

## *Utstyr*

Pumpe Amersham Biosciences Pump P-1

Fraksjonssamler Amersham Biosciences Frac-920

Sentrifugerør RB, 14 ml (Heger AS)

## *Prosedyre*

### **Pakking av kolonne**

Pakking av kolonne ble utført av Torun Aslaksen, høsten 2007.

- A. Tørr Bio-Gel® P-6 ble overført til et begerglass med destillert vann
- B. Gelblandingen ble satt til henstand i 4 timer ved romtemperatur
- C. Halvparten av supernatanten ble dekantert av
- D. Resten av gelblandingen ble overført til en erlenmeyerkolbe, koblet til vakuum og degasset i 10 minutter
- E. 2 kolonnevolum degasset destillert vann ble tilsatt under forsiktigomrøring
- F. Etter at 90-95% hadde lagt seg på bunnen ble supernatanten dekantert av
- G. Trinn E-G ble gjentatt 4 ganger
- H. Den ferdige gelen ble overført til kolonnen med forsiktighet, for å unngå luft i gelen
- I. Kolonnen ble eluert med 2 kolonnevolum destillert vann

### **Eluering av standarder**

- A. 100 ml standardløsning ble applisert på kolonnen og eluert med destillert vann
- B. 96 fraksjoner ble samlet opp og sjekket for karbohydratinnhold ved hjelp av fenolssvovelsyretest, metode 6.1.7.

### **Eluering av prøver**

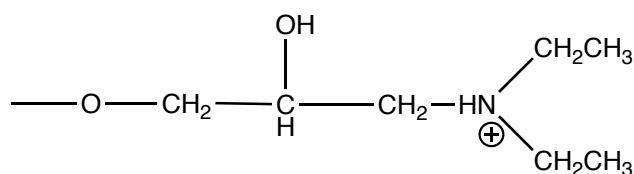
- A. 100 ml filtrert prøveløsning (metode 6.1.4) ble applisert på kolonnen
- B. Kolonnen ble så eluert med degasset destillert vann
- C. 96 fraksjoner ble samlet og sjekket for karbohydratinnhold ved hjelp av fenolssvovelsyretesten, metode 6.1.7
- D. Kolonnen ble vasket med 1,5-2 kolonnevolum degasset destillert vann

### 6.3.3 Ionebytterkromatografi med ANX sepharose

#### Prinsipp

Metoden baseres på utveksling av ioner mellom en fast stasjonærfase og en mobilfase i løsning. Stasjonærfasen er en uløselig matriks kovalent bundet til ioniske eller ioniserbare grupper. Til denne ioniske funksjonen er utbyttbare motoner tilknyttet, og stasjonærfasen kalles derfor en ionebytter. Separasjon av stoffer skjer ved reversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Ulike forbindelser vil ha ulik affinitet for ionebytteren på grunn av ladningsforskjeller. Mobilfasens egenskaper kan endres underveis, og dermed vil forbindelsene elueres ut forskjellig. Eluering med økende ionestyrke vil gi separasjon basert på ladning (Greibrokk *et al.*, 2005; J.W. Cappelens Forlag AS, 2008).

ANX Sepharose<sup>TM</sup> 4 fast flow ionebytter (figur 6-2.) er en svak anionbytter basert på kryssbundet agarose, noe som gir mediet en høy kjemisk og fysisk stabilitet (Amersham Pharmacia Biotech AB, 2000). Dette bærematerialet er gelkuler dekket med aminogrupeer, som har plussladning ved nøytral pH. Nøytrale polysakkarider vil elueres gjennom kolonnen, mens sure polysakkarider vil stoppe opp og forsinkes. Ved å benytte en gradient med økende saltkonsentrasjon (NaCl opp til 2 molar), vil sure polysakkarider selektivt elueres ut. Etter hvert som saltkonsentrasjonen øker, vil saltionene erstatte polysakkaridenes midlertidige posisjon på gelkulene. Separasjonen baseres på at de svakt negativt ladede polysakkaridene elueres først og sterkt negativt ladede sist (Plantebiosenteret, 2002).



ANX sepharose - svak anionbytter

Figur 6-2 Strukturen til ANX sepharose anionbytter

#### Prøver (se figur 3-1)

50%B (3,8 mg/ml)

50vB (5,6 mg/ml)

100vB<sub>1</sub> (ukjent konsentrasjon)

100vB<sub>2</sub> (2,8 mg/ml)



---

### *Spesifikasjoner for metoden*

Pakkemateriale: ANX Sepharose<sup>TM</sup> 4 Fast Flow (high sub)

Cas.nr: 17-1287-01

Batch: 304959

Kolonne: XK50

Kolonnevolum: Ca 1000 ml

Mengde ekstrakt: 170-350 ml, filtrert med sprøyte med 5 µm filter eller 0,22 µm filter

Elueringshastighet: 2 ml/min

Elueringsmidler:

Degasset destillert vann

0-2 M NaCl (aq)

Fraksjonsstørrelse: 10 ml

### *Utstyr*

Pumpe Spetec Perimax

Fraksjonssamler Pharmacia LKB Super Frac

Magnetrorer RCT Basic Kika Labortechnik (Heigar)

Sentrifugerør RB, 14 ml (Heger AS)

### *Prosedyre*

#### **Pakking av kolonne**

Pakking av kolonne ble utført av Torun Aslaksen, høsten 2007.

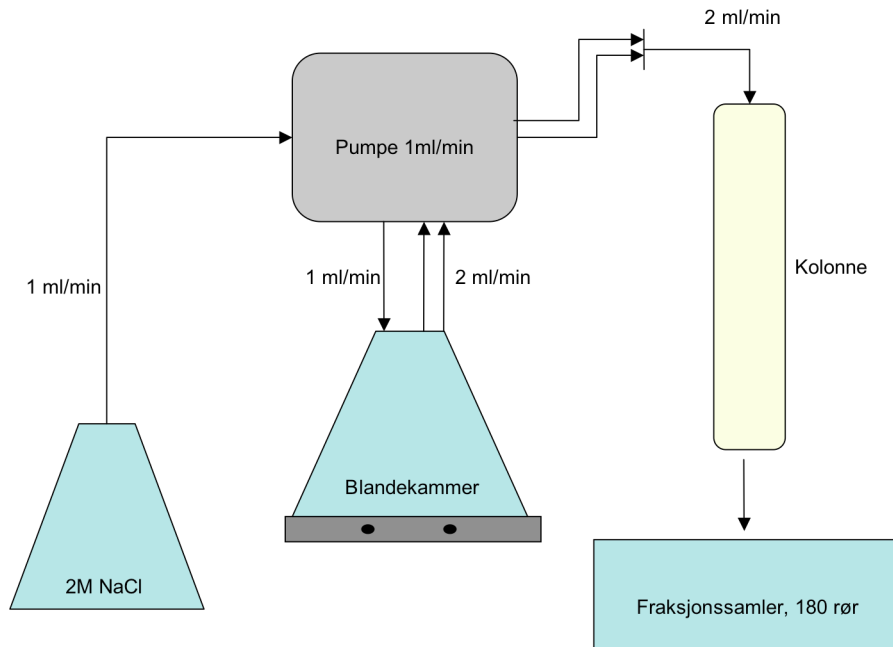
- A. En 20% etanol suspensjon med pakkemateriale ble overført kolonnen
- B. Supernatanten ble dekantert av etter henstand
- C. Kolonnen ble vasket med 2 kolonnevolum destillert vann

#### **Eluering**

- A. Prøven ble applisert på kolonnen med hastighet 2 ml/min
- B. Kolonnen ble eluert med 1,5 kolonnevolum destillert vann for å få ut nøytrale substanser
- C. Kolonnen ble eluert med gradienteluering 0-2 M NaCl på 900 minutter, med hastighet 2 ml/min (figur 6-3)

## Rensing og regenerering av kolonne

- A. Kolonnen ble vasket med ett kolonnevolum 2M NaCl
- B. Kolonnen ble vasket med 5 kolonnevolum med destillert vann, inntil 2 ml av det eluerte vaskevannet ikke ble blakket av 2 dråper mettet  $\text{AgNO}_3$



Figur 6-3. Oppsett for ionebytterkromatografi med saltgradient 0-2 M.

## 6.4 Biologisk aktivitet

### 6.4.1 Komplementfikseringstest

(Yamada & Kiyohara, 1999; Michaelsen *et al.*, 2000)

Denne testen er utført på Folkehelseinstituttet.

#### Prinsipp

Prøvematerialet inkuberes med komplement, slik at den får tid til å påvirke komplementet.

Røde blodceller fra sau sensibiliseres med antistoff fra kanin. Dette gir komplement mulighet til å binde seg og aktivere komplementkaskaden, noe som vil resultere i at blodcellemembranen perforeres og hem går i oppløsning slik at cellene lyseres (hemolyse).

De sensibiliserte røde blodcellene tilsettes komplementet, og grad av hemolyse vil si noe om prøvens påvirkning på komplement. Dersom hemolysen er lik for prøven og kontrollen betyr

dette at komplementet er upåvirket. En redusert hemolysegrad indikerer at komplementet er konsumert. Testsystemet sier ikke noe om komplementsystemet hemmes eller aktiveres av prøven. En nedgang i hemolyse er kun en indikasjon på at prøven påvirker komplement, og dermed sies å være komplementfikserende. Prøvenes effekt sammenlignes med den komplementfikserende evnen til PMII.

## ***Prøver***

Alle fraksjonene er testet for komplementfikserende effekt (se figur 3-1).

## ***Reagenser***

Veronal/BSA buffer:	CFT pH 7,2 med 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) 30 % og 0,02 % $\text{NaN}_3$ -løsning
Blodceller fra sau:	hvit 131, tappet 11/10-07 hvit 131, tappet 17/01-08
Komplementkilde:	ECG (1:40 i veronalbuffer) ECG (1:55 i veronalbuffer)
Standard:	<i>Plantago major</i> L, fraksjon II (PMII), 1 mg/ml
Antistoff:	Virion 9020 Amboceptor serum hemolysisia

## ***Utstyr***

Multipipette  
Finnpipette  
Mikrotiterplater Nunc med flat bunn  
Mikrotiterplater Nunclon surface Nunc Immunoplate  
Sentrifuge Heraeus Sepatech Megafuge 3,0 R  
Whirlmixer Labinco

## ***Prosedyre***

### **Vasking av saueblodceller før sensibilisering**

100  $\mu\text{l}$  saueblod per plate ble tatt ut og vasket to ganger med 0,9 % NaCl og en gang med veronal/BSA buffer.

### Sensibilisering av saueblodceller (til en full plate)

15 µl 9020 ble tilsatt 60 µl pakkede blodceller og 5,925 veronal/BSA buffer. Blandingen ble inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C, og deretter vasket to ganger med 0,9% NaCl og en gang med veronal/BSA buffer. Det ble sentrifugert mellom hver gang. Vaskevannet ble fjernet og blodet ble fortynnet med 5,940 ml veronal/BSA buffer. Resultatet var da 1% SRBC (sensibiliserte blodceller)

### Titreringskurve for komplementkilden

Det ble laget ulike fortynninger av komplement og buffer (tabell 6-1).

Forhold (komplement:buffer)	Komplement (µl)	Veronal/BSA buffer (µl)
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890
1:100	10	990
1:110	10	1090
1:120	10	1190

*Tabell 6-1. Forhold mellom komplement:buffer.*

4 brønner ble tilsatt 100 µl destillert vann og 24 brønner ble tilsatt 50 µl buffer. 50 µl komplement ble tilsatt brønnene med buffer (4 av hver fortynning). Det ble tilsatt 50 µl 1% SRBC til hver brønn, og så inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C. Platen ble sentrifugert i 4 minutter ved 500-1000 g. 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet plate. Absorbans ble avlest som for prøvene (se under). Deretter beregnes lyseringsgraden for de ulike fortynningene ved hjelp av formel 6-1. Lyseringsgraden gjenspeiler hvor mye komplement i seg selv ødelegger systemet. Anbefalt lyseringsgrad er 50 %. Den fortynningen med lyseringsgrad nærmest 50 ble benyttet under komplementfikseringstest.

$$\text{Lyseringsgrad} = (\text{Abs}_{\text{kontroll}} / \text{Abs}_{\text{dest.vann}}) * 100 \%$$

*Formel 6-1. Beregning av lyseringsgrad*

### Fortynning av prøvene

Prøvene ble løst i veronal/BSA buffer slik at konsentrasjonen var 1 mg/ml (stamløsning). Deretter ble det laget en firefolds fortynningsrekke (tabell 6-2).

Rørnummer	Konsentrasjon	Innhold
Rør 1	500 µg/ml	300 µl buffer + 300 µl stamløsning
Rør 2	125 µg/ml	300 µl buffer + 100 µl fra rør 1
Rør 3	31,3 µg/ml	300 µl buffer + 100 µl fra rør 2
Rør 4	8 µg/ml	300 µl buffer + 100 µl fra rør 3
Rør 5	2 µg/ml	300 µl buffer + 100 µl fra rør 4
Rør 6	0,5 µg/ml	300 µl buffer + 100 µl fra rør 5

**Tabell 6-2. Fortynningsrekke av prøvene**

### Komplementfikseringstest

Til en mikrotiterplate (Nunc surface Nunc Immunoplate) ble det overført to paralleller (50 µl x 2) av hver prøve og PMII-standard, samt 100 µl destillert vann (100% lysekontroll) i fire brønner og 50 µl veronal/BSA buffer (kontroll) i fire brønner, slik tabell 6-3 viser.

Prøve	Konsentrasjon (µg/ml)											
	500		125		31,3		8		2		0,5	
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
PMII	Std	Std	Std	Std	Std	Std	Std	Std	Std	Std	Std	Std
Kont.	L	L	L	L	K	K	K	K	--	--	--	--

**Tabell 6-3. Oversikt over plate til komplementfikseringstest. P; prøve, Std; PMII standard, L; 100% lysekontroll, K; kontroll**

Alle brønnene, unntatt 100% lysekontroll, ble tilsatt 50 µl komplement rett fra fryseren.

Platen ble dekket med bred, blank tape og satt på resting ved 37 °C i 30 minutter. Deretter ble det tilsatt 50 µl 1% SRBC til hver brønn, og platen ble inkubert med resting i 30 minutter ved 37 °C. Platen ble tilslutt sentrifugert i 4 minutter ved 500-1000 g, og så ble 100 µl av hver brønn tilsatt en flatbunnet plate. Absorbansen ble målt ved 405nm på Microplate reader (MR 700- Dynatech)

### Beregning av % hemming

For å beregne % hemming av hemolyse fra de ulike fraksjonene benyttes formel 6-2.

$$\% \text{ hemming} = [(Abs_{\text{kontroll}} - Abs_{\text{prøve}}) / Abs_{\text{kontroll}}] * 100 \%$$

**Formel 6-2. Beregning av % hemming av hemolyse.**

## 6.4.2 Antimikrobiell effekt – disc diffusion

### *Prinsipp*

Bakterier og sopp dyrkes på agarskåler over 24 timer, og deretter sås 2-3 kolonier fra hver skål ut på nye agarskåler. Test-substansene appliseres på filterpapir som legges på de nye skålene med en viss avstand, eller tilsettes direkte til brønner i skålene. De nye skålene inkuberes, og hemmingssonene for prøvene sammenlignes med standarder. Dette gir en indikasjon på den antimikrobielle effekten av prøvene.

### *Prøver (se figur 3-1)*

Løst i metanol (20 mg/ml):

- 96%RÅ
- 50 %MET

Løst i destillert vann (20 mg/ml):

- 50%RÅ og 50%B
- 50vRÅ og 50vB
- 100vRÅ og 100vB<sub>2</sub>

### *Mikroorganismer*

1. Kokorus rhizinophilia	G+	aerob bakterie
2. Bacillus subtilis	G+	aerob bakterie
3. Eschericia coli	G-	aerob bakterie
4. Pseudomonas aerugeinosa	G-	aerob bakterie
5. Staphylococcus aureus	G+	aerob bakterie
6. Candida albicans		aerob sopp

### *Kontroll-løsninger*

- Kloramfenikol 0,1 mg/ml (positiv kontroll for mikroorganisme nr. 1 og 2)
- Gentamicin 0,2 mg/ml (positiv kontroll for mikroorganisme nr. 3, 4 og 5)
- Sulconazol 0,5 mg/ml (positiv kontroll for mikroorganisme nr. 6)
- Metanol (negativ kontroll for mikroorganisme nr. 1-6)

---

## *Reagenser*

McFarland standard 2:        0,2 ml 1.0% bariumklorid  
   9,8 ml 1.0% svovelsyre

## *Utstyr*

Alt glassutstyr som ble brukt i dette forsøket var varmesterilisert.

Varmeskap Heraeus Instruments Fraction Line UT6

Agarskåler, diameter 9cm:        Müller Hinton medium (til bakterier)  
   Sabouraud medium (til sopp)

Oxoid culti-loop

Høstepinner

Pasteurpipette 20- 200 µl og 200-1000 µl

Plastipak engangssprøyte (10 ml)

Millex GP Filter Unit 0,22 µm

Målesylindere 25 ml og 50 ml

Begerglass

Metyleringsrør med skrukork (15 ml og 40 ml)

Jern til å lage hull (0,9 cm)

Filterpapir BBL<sup>TM</sup> Blank Paper Discs, diameter 6 mm

## *Prosedyre*

Metoden ble utført med aseptisk teknikk

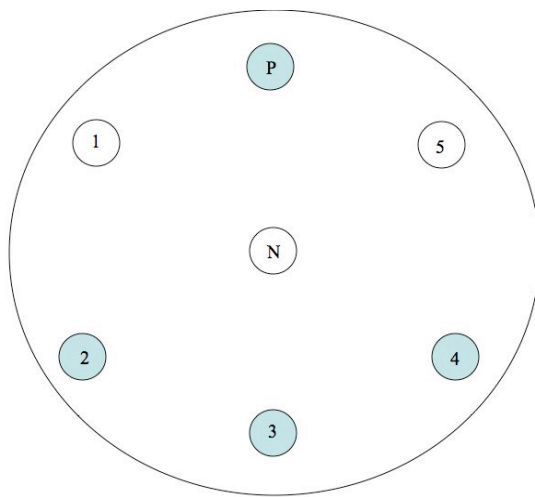
### **Utsåing av mikroorganisme**

- A. Agarskålene ble satt i varmeskap ved 37 °C i en time
- B. En høstepinne ble fuktet på agarskålen 10-15 sekunder før mikroorganismen ble strøket ut på skålen
- C. Skålene ble plassert i varmeskap med lokket ned, og inkubert i 24 timer og 48 timer for henholdsvis bakterier og sopp ved 37 °C

### **Påsetting og testing av prøve**

- A. Fysiologisk saltvann 0,9 % sterilfiltreres (0,22 µm)
- B. 2-3 ferdigvokste kolonier med sopp eller bakterie ble skrapet av skålen og suspendert i ca 2 ml sterilt fysiologisk saltvann, slik at tettheten tilsvarte Mc Farland standard 2

- C. 120 µl av suspensjonen ble overført til 25 ml sterilt fysiologisk saltvann, og blandet godt
- D. 2 ml av dette inokulatet ble overført til en ny agarskål, og skålen ble vippet slik at hele overflaten ble fuktet. Overskudd av inokulat ble fjernet med pasteurpipette, og skålen ble satt tilside i 15 minutter med lokket delvis på til overflaten var tørr
- E. Det ble trykket ut brønner til positiv kontroll og til prøvene som var løst i vann, og 50 µl av kontroll og prøve ble applisert i hver sin brønn (punktene P og 2, 3 og 4 på figur 6-4).
- F. 100 µl av prøvene som var løst i metanol ble applisert på filterpapir. Filterpapirene ble så satt til tørking, og lagt på skålene. 100 µl metanol ble applisert på filterpapir som negativ kontroll (punktene N, 1 og 5 på figur 6-4).
- G. Skålene sto i romtemperatur i en time før inkubering i varmeskap ved 37 °C
- H. Hemningssoner ble avlest med linjal etter 24 timer (bakterier) og 48 timer (sopp)



*Figur 6-4 Mal for plassering av brønner og filterpapir på agarskålene. Punktene P, 2, 3, og 4 tilsvarer brønnene, mens punktene N, 1 og 2 tilsvarer filterpapirene. P; positiv kontroll, N; negativ kontroll*

### 6.4.3 Påvirkning på CYP3A4 + b5 – metabolisme av midazolam

Denne testen er utført ved avdeling for farmasøytisk biokjemi, Universitetet i Oslo, under veiledning fra Hege Christensen og Siri Johannesen.

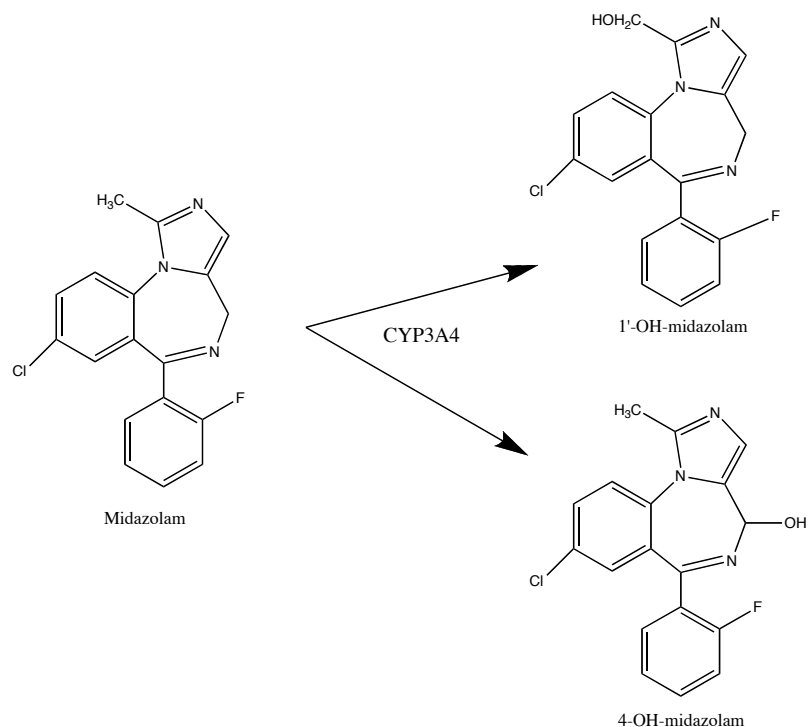
#### *Prinsipp*

Midazolam er et substrat for CYP3A4 metabolisme. I kroppen omdanner CYP-enzymet fremmede substanser til mer vannløselige metabolitter, slik at disse skilles ut raskere.

Midazolam omdannes av CYP3A4 til to hovedmetabolitter, 1'-OH-midazolam og 4-OH-midazolam, slik figur 6-5 viser. Med denne metoden kan man undersøke om ulike prøver



påvirker metaboliseringen av midazolam. Metoden baseres på å utsette midazolam for CYP3A4 med og uten prøver tilstede, og deretter sammenligne resultatene. Ved å bruke LC-MS vil det være mulig å detektere hvor mengden metabolitt som er dannet.



*Figur 6-5 Dannelsen av de to hovedmetabolittene ved metabolisering av midazolam via CYP3A4.*

### **Prøver (se figur 3-1)**

Prøver løst i metanol (1 mg/ml):

96%RÅ

50%MET

Prøver løst i bufferløsning (1 mg/ml)

50%RÅ og 50%B

50vRÅ

100vRÅ

### **Mikrosom-batch**

Supersomer CYP3A4 + b5, fortynning 1:64 (16 µl + 984 µl Lise Madsen buffer)

## *Reagenser*

Bufferløsning:

Trisbuffer, Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (200 mM)

MgSO<sub>4</sub> (20 mM)

NADPH (10 mM)

Mobilfase A: 0,05 M ammoniumformiat-buffer pH 4,4

NH<sub>3</sub> 25 % 4,036 ml

Konsentrert HCOOH 2,125 ml

Ionebyttet vann 1 L

Intern standard: Diazepam 0,044 µM i acetonitril

## *Utstyr*

Vannbad med risting, Gallenkamp

Whirlmikser<sup>TM</sup> Fisons WM/250/SCP/2

## *Prosedyre*

- A. Ikke-vandige prøver ble løst i metanol (1 mg/ml), og 100 µl prøve ble overført til reagensrør av glass, og dampet av under nitrogengass. Deretter ble 149 µl bufferløsning tilsatt
- B. Vandige prøver ble løst i trisbuffer (1 mg/ml), og 100 µl prøve ble overført til reagensrør og tilsatt 13 µl trisbuffer, 5 µl MgSO<sub>4</sub> og 30 µl NADPH.
- C. 22 µl av en 20 µM midazolamløsning i bufferblanding ble tilsatt alle rørene slik at midazolamkonsentrasjonen var 2 µM
- D. Prøvene ble blandet godt og preinkubert på vannbad i 5 minutter (37 °C)
- E. 50 µl mikrosomer per rør ble varmet på vannbad ved 37 °C i et par minutter, før tilsetting til prøvene
- F. Reagensrørene ble inkubert på vannbad (37 °C) med risting i 7,5 minutter
- G. Glassrørene ble tilsatt 220 µl etylacetat og vippt forsiktig
- H. Det øverste sjiktet ble fjernet
- I. Trinn G-H ble gjentatt
- J. Prøvene ble dampet inn til tørrhet under nitrogengass og løst i 74 µl mobilfase A

- K. 50 µl acetonitril med diazepam som intern standard ble tilsatt, og blandet godt
- L. Prøvene ble oppbevart i fryser frem til analyse på LC-MS

### ***LC-MS analyse***

Væskekromatografi (liquid chromatography, LC) baseres på at en mobilfase i væskeform presses gjennom en kolonne pakket med en stasjonærfase, gjerne pakke med partikler. Prøven injiseres i mobilfasen og føres gjennom kolonnen med konstant hastighet. Stasjonærfasen retarderer stoffene i ulik grad, slik at de separeres. Væskekromatografi kombinert med massespektrometri (LC-MS) er en metode der stoffer først separeres kromatografisk ved å passere gjennom en kolonne, og etter hvert som stoffene når massespektrometeret vil de ioniseres og fragmenteres. Massespektrometeret, som i dette tilfellet fungerer som en avansert detektor, vil ta opp massespektre for hvert stoff som er separert og plote et kromatogram som viser en topp for hvert stoff. Hver topp har tilhørende massespektre der fragmenteringen vises, og ved å undersøke disse spektrene kan stoffene identifiseres eller karakteriseres (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2004).

### **Spesifikasjoner for metoden**

Liquid Chromatograph (Schimadzu)

Kolonne (Varian): Inerstil C8

50 mm lengde, 3 mm indre diameter

5 µm partikkelstørrelse

Injeksjonsvolum: 10 µl

Eluering: Gradienteluering 17 minutter

mobilfase A (som over) og mobilfase B (95 % acetonitril og  
5 % metanol)

Hastighet: 0,5 ml/min

Massespektrometer: LC-MS-2010 A (Schimadzu)

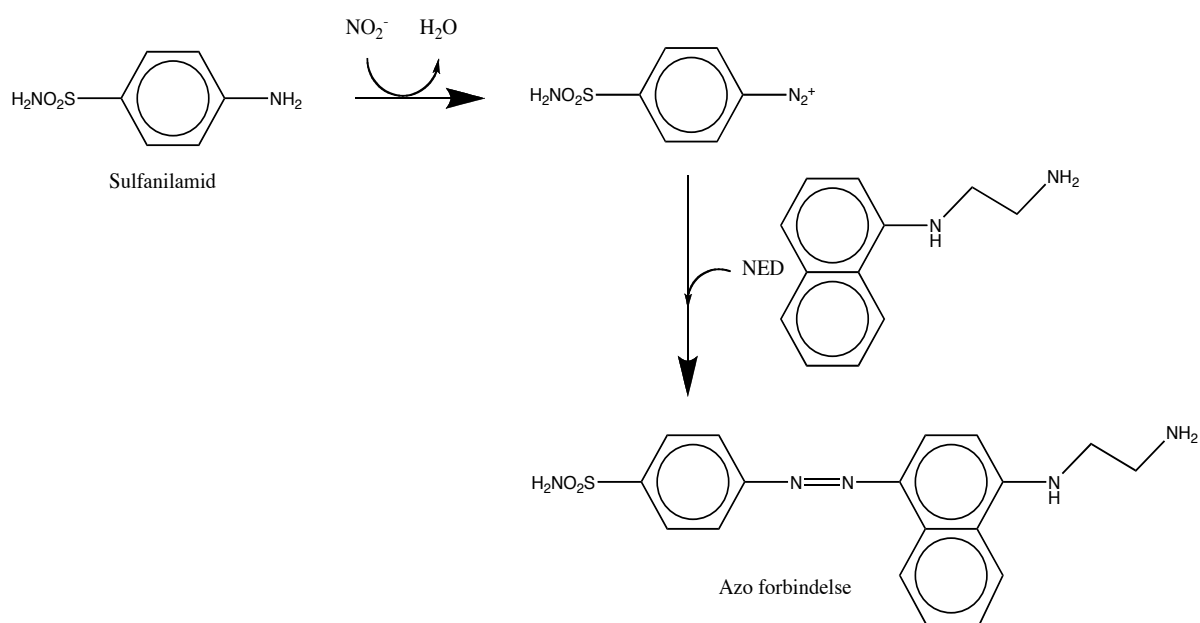
### 6.4.4 Måling av NO-frigjøring fra makrofager – Greiss Reagent System

(Promega, 2005)

Denne testen ble utført av Parakashtha Ghildyal på Rikshospitalet i 2008.

#### Prinsipp

Nitrogenoksid, NO, er et viktig fysiologisk signal- og effektormolekyl i mange biologiske systemer, blant annet i immunologiske, nevronale og kardiovaskulære vev. Dannelsen av NO kan undersøkes ved å måle mengden nitritt,  $\text{NO}_2^-$ , som er ett av nedbrytningsproduktene til NO, og dette gjøres ved å benytte Greiss Reagent System. Metoden baseres på en kjemisk reaksjon der sulfanilamid og N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) benyttes under sure forhold (figur 6-6).



Figur 6-6. Kjemisk reaksjon for Greiss Reagent System.

Azo forbindelsen er en lillafarget forbindelse som absorberes UV lys. Dermed kan et absorbansspekter plottes, og ved å sammenligne resultatet med en nitritt standard referanse kurve kan mengden frigjort NO beregnes.

### *Prøver (se figur 3-1)*

50%RÅ	2 mg med konsentrasjon 21,4 mg/ml (w/v)
50%B	2 mg med konsentrasjon 5,6 mg/ml (w/v)
50vRÅ	2 mg med konsentrasjon 12,2 mg/ml (w/v)
100vRÅ	2 mg med konsentrasjon 12,6 mg/ml (w/v)

### *Reagenser*

Dyrkningsmedium: RPMI 1640, tilsatt 10% kalveserum, 1% penicillin/streptomycin og 2 mM L-glutamin,  $5 \cdot 10^{-5}$  M 2-mercaptoetanol

Greiss Reagent A: Sulfanilamid-løsning 1%

Greiss Reagent B: N-(1-naptyl)etylendiamin (NED) 2,5% fosforsyre

NaNO<sub>3</sub>-standard 0,1 M

Negativ kontroll: lipopolysakkarid (LPS)

Buffer til Coulter Counter: Isoton buffer II

### *Utstyr*

Mikrotiterplate med falt bunn, V-bunn og U-bunn

Cellteller Coulter Counter

Inkubatorskap med CO<sub>2</sub> kontroll

Absorbansmåler Titertek multiscan

### *Prosedyre*

- A. Makrofager ble høstet fra en cellekultur. 20 µl celleduspensjon ble tilsatt 10 ml isoton buffer II, og cellene ble telt.
- B. Cellene ble spunnet ned ved 1300 rpm i 8 minutter
- C. Deretter ble cellene resuspendert i dyrkningsmedium til 106 celler/ml
- D. 50 µl celler ble tilsatt hver brønn
- E. Det ble laget fortynningsrekke av prøvene, slik at konsentrasjonene var 100 µg/ml, 10 µg/ml og 1 µg/ml
- F. 5 µl av hver prøve ble tilsatt brønnene i tripletter
- G. Som positiv kontroll ble det benyttet 2 paralleller med 500 ng/ml LPS, og som negativ kontroll ble det benyttet rent medium
- H. 45 µl dyrkningsmedium ble tilsatt hver brønn (totalvolumet = 100 µl/brønn)

- I. Cellene ble inkubert ved 37 °C i en celleinkubator med 4 % CO<sub>2</sub> over natta
- J. Platen ble sentrifugert for å fjerne cellene
- K. 50 µl av supernatanten ble overført til en mikrotiterplate med U-bunn
- L. Kolonne B-H på figur 6-7 ble benyttet som referansebrønner. Det ble laget en 6-serie tofoldsfortynning av NaNO<sub>3</sub> (konsentrasjoner på 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12 µM, 6 µM, 3 µM og 0 µM).
- M. Trinn F-K ble utført for standardløsningene
- N. 50 µl Greiss reagens A ble tilsatt alle brønner
- O. Platen ble inkubert i 5-10 minutter ved romtemperatur, beskyttet for lys
- P. 50 µl Greiss reagens B ble tilsatt alle brønner
- Q. Platen ble inkubert i 5-10 minutter ved romtemperatur, beskyttet for lys
- R. Absorbans ble målt ved 540 nm, innen 30 minutter

NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µM)		NaNO <sub>3</sub> standard referanse kurve			Eksperimentelle prøver							
100	A	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
50	B	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
25	C	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
12,5	D	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
6,25	E	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
3,13	F	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
1,56	G	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
0	H	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○

Figur 6-7 Mal for platen. Sorte brønner tilsvarer standard referansekurven, mens hvite brønner ble benyttet til eksperimentelle prøver.

For å sette opp standard referanse kurven ble gjennomsnittabsorbans for hver konsentrasjon av NaNO<sub>3</sub>-standard plottet som en funksjon av "Y" med NaNO<sub>3</sub>-konsentrasjon som en funksjon av "X". For hver prøve ble det bestemt gjennomsnittelig absorbansverdi, og konsentrasjonen ble bestemt ved å sammenligne med referansekurven.

## 6.5 Monosakkaridbestemmelse

### 6.5.1 Metanolyse, TMS-derivatisering og GC-FID

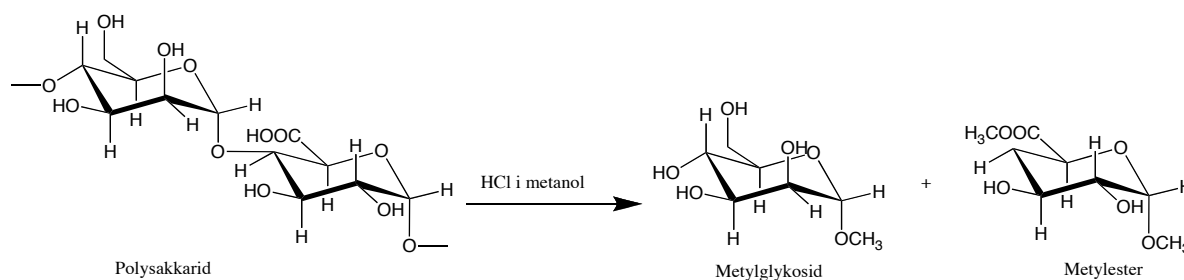
Denne metoden kan benyttes for å få informasjon om sammensetningen av monosakkarider i en prøve. Metoden er delt inn i 3 deler der polysakkaridene metanolyses (metanolyse), forbindelsen derivatiseres slik at de blir flyktige (TMS-derivatisering) og deretter analyseres de ved hjelp av gasskromatografi med flammeioniseringsdeteksjon (GC-FID). Alle fraksjonene ble analysert med metoden (se figur 3-1).

#### *Metanolyse*

(Chambers & Clamp, 1971)

#### **Prinsipp**

For å få informasjon om sammensetningen av monosakkarider i en prøve kan polysakkarider metanolyses ved å benytte sterk syre i vannfri metanol. Glykosidbindingene kløyves, og det dannes metylglykosider av monosakkaridene, slik figur 6-8 viser.



*Figur 6-8. Metanolyse av et polysakkarid.*

#### **Reagenser**

4M HCl:Metanol

Mannitol:Metanol (1 µg/µl)

Vannfri metanol

#### **Utstyr**

Syrevaskede prøveglass

Pasteurpipette

Syreresistent glasspipette

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> eksikator

Varmeskap Heraeus Instruments Fraction Line UT6

### Prosedyre

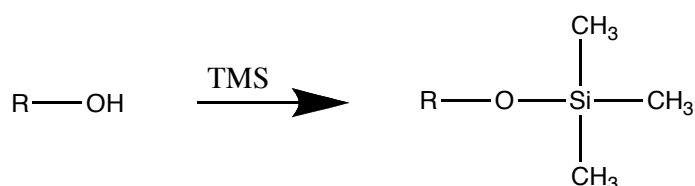
- A. 1 mg prøve ble veid inn i syrevaskede prøveglass
- B. Prøvene ble satt i vakuumeksikator i 4 timer
- C. 1 ml 4M HCl i metanol ble tilsatt
- D. 100 µl mannitol (1 µg/µl) i metanol ble tilsatt
- E. Prøvene ble satt i varmeskap (80°C) i 24 timer
- F. Prøvene ble dampet inn til tørrhet under nitrogengass ved 40°C
- G. 200 µl vannfri metanol ble tilsatt
- H. Prøvene ble dampet inn til tørrhet under nitrogengass ved 40°C
- I. Trinn G-H ble gjentatt 2 ganger
- J. Prøvene ble videre tørket i eksikator i en time

### TMS-derivatisering

(Sweeley *et al.*, 1963)

### Prinsipp

Mange forbindelser er lite flyktige og vil vanskelig fordampe. Hydroksyl-, fenol-, amino- og karboksylgrupper nedsetter stoffers flyktighet, og forårsaker i tillegg adsorpsjon til overflater og dermed haledannelse i kromatogrammet. Derivatisering er en metode for å lage flyktige og termisk stabile derivater av forbindelsene, slik at de bedre egner seg for analyse med GC. Ved å benytte tetrametylsilan (TMS) som reagens vil funksjonelle grupper med aktive H-atomer, for eksempel OH, COOH, NH<sub>2</sub> og NH, erstattes med en trimetylsilylgruppe (figur 6-9). (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2004)



Figur 6-9 Derivatisering av OH-gruppe.

### Reagenser

TMS:	Trimetylklorasilan	1 ml
	Heksametyldisilazan	2 ml
	Pyridin, vannfri	5 ml



## Utstyr

Transferpettor® 100 µl

SMI glassrør (blå), syrevaskede

## Prosedyre

A. 200 µl TMS ble tilsatt de metanolyserte prøvene

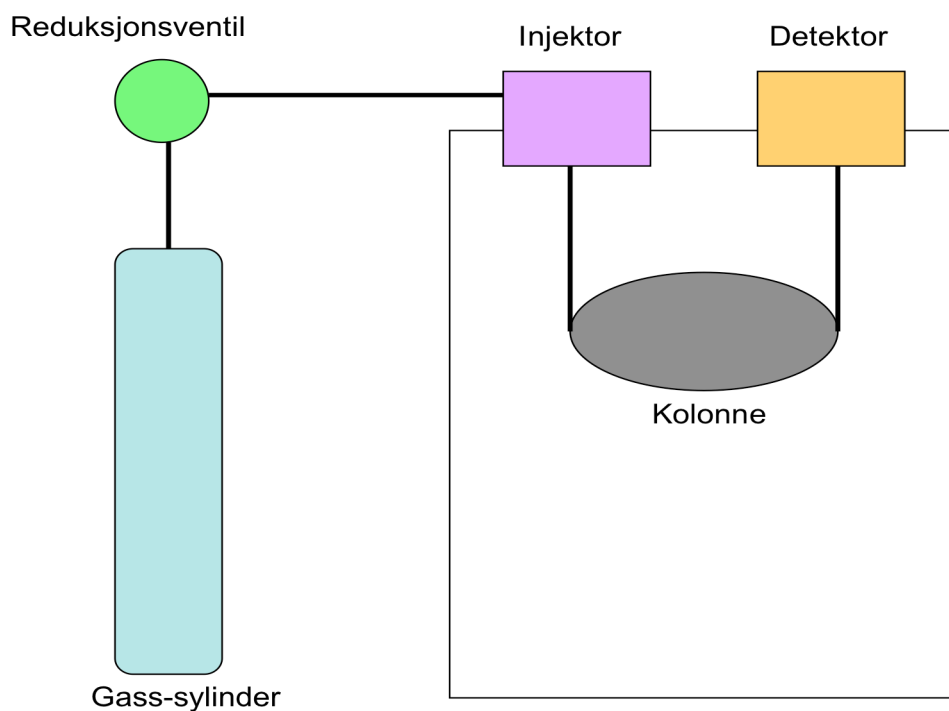
B. Etter 30 minutter ble prøven injisert på GC

## GC-FID

### Prinsipp

(Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2004)

Gasskromatografi baseres på å separere flyktige forbindelser. Når prøven injiseres, fordampes den og bringes gjennom kolonnen ved hjelp av en bæregass. De ulike forbindelsene vil fordele seg ulikt mellom stasjonærfasen og bæregassen, og føres med forskjellig hastighet gjennomkolonnen. Forbindelsene vil separeres, og kan detekteres ved hjelp av ulike detektorer. Flammeionisasjonsdetektoren, FID, måler den elektriske strømmen som oppstår fra ladede ioner, når organiske forbindelser brenner i en flamme (figur 6-10).



Figur 6-10 Enkel skisse av oppsett for gasskromatografi.

**Spesifikasjoner for metoden**

Gasskromatograf: GC 6000 Vega Series 2

Integrator: C-R6A Chromatopac

Injektor: Splitt:splittless

Kolonne: DB5 fused silica

Bæregass: Helium

Bærehastighet: 1,8 ml/min

Injeksjonsvolum: 0,5 µl

Detektor: Flammeionisering

**Prosedyre**

- A. 1 µl prøve ble injisert via splittinjektor
- B. Kromatogram ble tatt opp
- C. Før ny injeksjon ble sprøyten vasket 3 ganger med pyridin

## 6.6 Struktur og bindingsforhold

### 6.6.1 Metylering

Metoden for metyleringsreaksjonen er delt inn i flere trinn. Når det gjelder polysakkarider baserer metoden seg på å sette metylgrupper på de frie OH-gruppene og acetylgrupper på OH-gruppene som har vært i binding, og deretter analysere på GC-MS, slik at struktur og bindingsmønster kan undersøkes. I metoden brytes i tillegg glykosidbindingene, og de resulterende derivatene gjøres flyktige, slik at de egner seg for gasskromatografisk analyse. Følgende prøver er analysert med denne metoden (se figur 3-1):

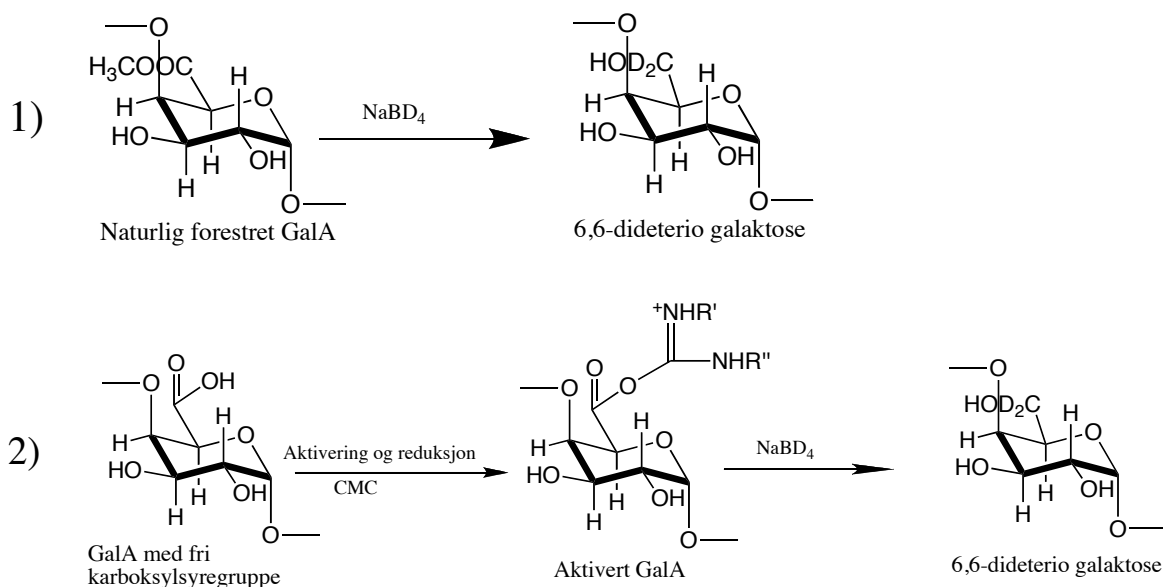
50%S1	0,13 mg/ml (w/v)
50%S3	0,33 mg/ml (w/v)
50vS1	0,05 mg/ml (w/v)
100vB <sub>1</sub> S2	0,18 mg/ml (w/v)

## Karboksylysyrreduksjon

(Kim & Carpita, 1992)

### Prinsipp

Uronsyrer fra plantepolysakkarider eller andre sure polysakkarider kan degraderes ved  $\beta$ -eliminering under basiske forhold som benyttes under metylering. I tillegg er sure polysakkarider generelt resistente mot syrehydrolyse, og dermed kan viktig informasjon om bindingsmønster gå tapt under analysen. Ved å kjemisk redusere karboksylsyregruppen kan disse problemene unngås. (Taylor & Francis) Esterifiserte karboksylsyregrupper reduseres selektivt med natrium borodeuterid ( $\text{NaBD}_4$ ) og danner 6,6-dideuterio-sukre (figur 6-11, del 1). Disse kan skilles fra nøytrale sukre i GC-MS ved tilstedeværelse av fragmenter med masse ( $M^+ + 2$ ). Frie uronsyrer kan ikke reduseres direkte, og må derfor aktiveres med carbodiimid, og deretter reduseres med borodeuterid (figur 6-11, del 2). I dette forsøket ble både esterifiserte karboksylsyregrupper og frie uronsyrer aktivert og redusert slik figur 6-11, del 2 viser.



Figur 6-11 Reaksjonene i karboksylsyrreduksjon.

### Reagenser

MES 0,2M (2-[N-Morpholino] etan svovelsyre)

Carbodiimid 500 mg/ml i vann

TRIZMA (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)

$\text{NaBD}_4$  100 mg/ml i 0,05M NaOH

## Utstyr

Rundkolber 25 ml

Pasteurpipette m/ballong

SMI pipette med syrevaskede glassrør

Varmeskap Heraeus Instruments Fraction Line UT6

PD10 kolonner

## Prosedyre

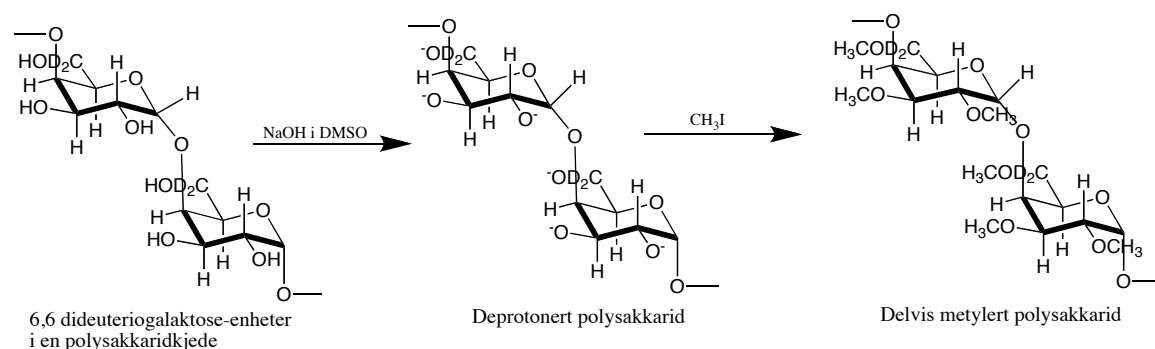
- A. 2 mg av hver prøve ble veid inn i en 25 ml rundkolbe og tilsatt 1 ml destillert vann
- B. 200  $\mu$ l 0,2M MES og 400  $\mu$ l carbodiimid-løsning ble tilsatt
- C. Prøvene ble inkubert i varmeskap ved 30 °C i 3 timer
- D. 1 ml TRIZMA ble tilsatt, og prøvene ble avkjølt på is
- E. 1 ml nylaget 100mg/ml NaBD<sub>4</sub> ble tilsatt, og prøvene ble inkubert ved 4 °C over natta
- F. Overskudd av reduktant ble ødelagt ved at prøvene porsjonsvis ble tilsatt 500  $\mu$ l iseddik
- G. Prøvene ble dampet inn på rotavapor til 2,5 ml, satt på PD10 kolonnen og eluert med destillert vann for å fjerne lavmolekylære stoffer
- H. Prøvene ble frysetørket over natta

## Metylering

(Ciucanu & Kerek, 1984; Ciucanu, 2006)

## Prinsipp

De frie OH-gruppene i polysakkaridene metyleres, slik at disse kan skilles fra OH-grupper som deltar i glykosidbindinger. I det første trinnet deprotoneres hydroxylgruppene ved tilstedeværelse av en base, og i det andre trinnet tilsettes en metyleringsreagens, og det dannes metyletere (figur 6-12).



Figur 6-12 Metylering av frie hydroksylgrupper.

---

**Reagenser**

Dimetylsulfoksid, DMSO

NaOH-pellets (oppbevart i P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> eksikator)

Metyljodid, CH<sub>3</sub>I

Natrium tiosulfat 100 mg/ml i vann

Kolorform

**Utstyr**

SMI pipette med syrevaskede glassrør

Metyleringsrør med skurkork

Morter og pistill

Ristemaskin IKA-VIBRAX-VXR

Whirlmixer™ Fisons WM/250/SCP/2

Sentrifuge Heraeus Multifuge 4KR

**Prosedyre**

- A. 500 µl DMSO ble tilsatt rundkolbene mer prøver, og disse ble proppet og satt på risting, 200 rpm i 20 minutter
- B. Prøveblandingene ble overført til metyleringsrør
- C. En suspensjon av NaOH pellets i DMSO ble laget ved å rive 2 pellets NaOH pr ml DMSO i morter
- D. 500 µl DMSO/NaOH suspensjon ble tilsatt prøveblandingene med en SMI glasspipette
- E. Metyleringsrørene med prøveblandingene ble blåst på med argongass, kork ble satt på og de ble satt på risting i 20-50 minutter
- F. 100 µl metyljodid ble tilsatt, rørene ble proppet og satt på risting i 10 minutter
- G. Punkt F ble gjentatt
- H. 200 µl metyljodid ble tilsatt, rørene ble proppet og satt på risting i 20 minutter
- I. 10 ml nylaget 100 mg/ml natrium tiosulfat i vann og 2 ml kloroform ble tilsatt, rørene ble proppet og blandet på whirlmikser i minst 40 sekunder (per kolbe)
- J. For å separere fasene ble rørene sentrifugert ved 1000 rpm i 3 minutter
- K. Supernatanten ble pipettert av og kastet
- L. Den gjenværende kloroformfasen ble vasket fire ganger med 5 ml destillert vann.
- M. Vannfasen og mellomsjiktet ble fjernet med pasteurpipette
- N. Den vaskede kloroformfasen ble tørket under nitrogengass

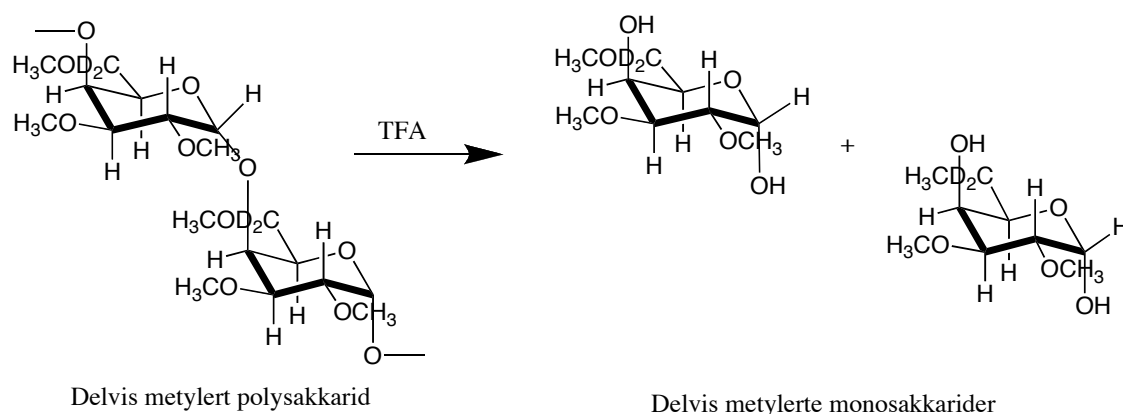
## Hydrolysering

(Kim & Carpita, 1992)

### Prinsipp

De delvis metylerte polysakkaridene hydrolyseres, slik at glykosidbindingene spaltes.

Produktet er delvis metylerte monosakkarider (figur 6-13).



Figur 6-13 Hydrolyse og spalting av glykosidbindinger.

### Reagenser

Trifluoreddiksyre (TFA) 2,5M

### Utstyr

Varmeskap Heraeus Instruments Fraction Line UT6

### Prosedyre

- A. 500 µl 2,5M TFA ble tilsatt de tørre metylerte prøvene og det ble blåst med argongass
- B. Prøvene ble hydrolysert i 2 timer ved 102 °C i varmeskap
- C. Prøvene ble avkjølt på benken og dampet inn til tørrhet under nitrogengass

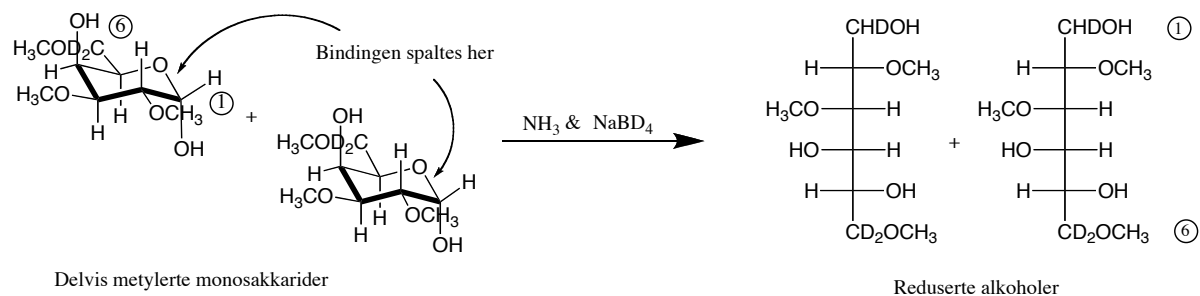
## Reduksjon

(Kim & Carpita, 1992)

### Prinsipp

Ved hjelp av reduksjon åpnes ringstrukturen i de delvis metylerte monosakkaridene, slik at resultatet blir alkoholer med struktur lignende Fischer-prosjeksjon (figur 6-14).

Monosakkaridene blir dermed klargjort for det siste trinnet i metyleringsprosessen, i tillegg til at ringåpningen gjør monosakkaridene mer flyktige og egnet for analyse med GC-MS.



*Figur 6-14. Reduksjon av aldehydfunksjonen i C1 av delvis metylerte monosakkarider fører til dannelsen av alkoholer.*

### Reagenser

2 M  $\text{NH}_3$

1M løsning av  $\text{NaBD}_4$  i 2M  $\text{NH}_3$

Iseddik

Metanol

### Utstyr

Ultralydbad Branson 220

Finnpipette 40-200  $\mu\text{l}$  og 200-1000  $\mu\text{l}$

### Prosedyre

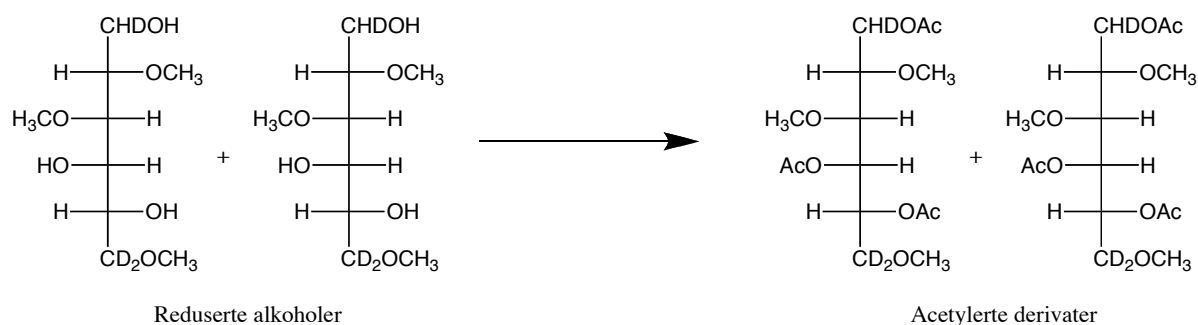
- Hydrolyserte prøver ble tilsatt 500  $\mu\text{l}$  2M  $\text{NH}_3$  og deretter 500  $\mu\text{l}$  av en 1M løsning av  $\text{NaBD}_4$  i 2M  $\text{NH}_3$
- Prøvene ble sonikert i ett minutt, og inkubert ved 60 °C i en time
- For å ødelegge overskudd reduktant ble 3x50  $\mu\text{l}$  iseddik forsiktig tilsatt prøvene
- Prøvene ble tørket ved 50 °C under nitrogen
- 2,5 ml 5% eddiksyre i metanol ble tilsatt og tørket ved 50 °C under nitrogen
- Punkt E gjentatt
- 2,5 ml metanol ble tilsatt og tørket ved 50 °C under nitrogen
- Punkt G ble gjentatt

## Acetylering

(Kim & Carpita, 1992)

### Prinsipp

De reduserte alkoholene acetyleres med eddiksyreanhydrid. De acetylerede derivatene som dannes er godt egnet for analyse med GC-MS (figur 6-15).



Figur 6-15. Acetyleringsreaksjonen.

### Reagenser

1-metylimidazol

Eddiksyreanhydrid

Diklormetan

Vannfri metanol

### Utstyr

Finnpipette 40-200 µl

Finnpipette 1-5 ml

Whirlmikser™ Fisons WM/250/SCP/2

Ultralydbad Branson 220

Sentrifuge Heraeus Multifuge 4KR

Supelcorør

### Prosedyre

- A. 200 µl 1-metylimidazol og 2 ml eddiksyreanhydrid ble tilsatt de reduserte prøvene, de ble blandet godt på whirlmikser, sonikert i 5 minutter og satt til henstand i 10 minutter
- B. 10 ml destillert vann ble tilsatt prøven, de ble blandet godt og satt til henstand i 10 minutter



- C. Delvis metylerte monosakkarider ble ekstrahert med 2 x 1 ml diklormetan, mikset på whirlmikser i 30 sekunder og deretter sentrifugert. Den nederste fasen ble tatt vare på hver gang, og slått sammen
- D. Ekstraktet ble vasket med 2 x 5 ml destillert vann og overført til supelcorør
- E. Ekstraktet ble så tørket under nitrogengass, og løst i 50 µl vannfri metanol før injeksjon på GC-MS

## GC-MS

(Lundanes, 1994)

### Prinsipp

Gasskromatografi baseres på å separere flyktige forbindelser (se GC-FID under metode 6.5.1). Separeringen kan detekteres med et massespektrometer, der forbindelsene bombarderes med en elektronstråle under vakuum, og ioniseres og fragmenteres til mindre enheter. Ioniserte molekyler (molekylioner) og eventuelle fragmenter separeres etter masse/ladningsforhold, detekteres av en detektor og gir et meget karakteristisk massespekter. (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2004)

### Spesifikasjoner for metoden

Gasskromatograf: GC Fisons 8000 series

Detektor: Massespektrometer Fisons MD-800

Kolonne: Factor Four VF-1ms

Lengde: 30 meter

Indre diameter: 0,25 mm

Filmtykkelse: 0,25 µm

Injektor: Splitt:splittless, splittforhold 1:10

Bæregass: Helium (1 ml/min)

Temperaturprogram:

80 °C (5 min)  $\xrightarrow{20^{\circ}\text{C/min}}$  170 °C  $\xrightarrow{0,5^{\circ}\text{C/min}}$  200 °C  $\xrightarrow{30^{\circ}\text{C/min}}$  280 °C

### Prosedyre

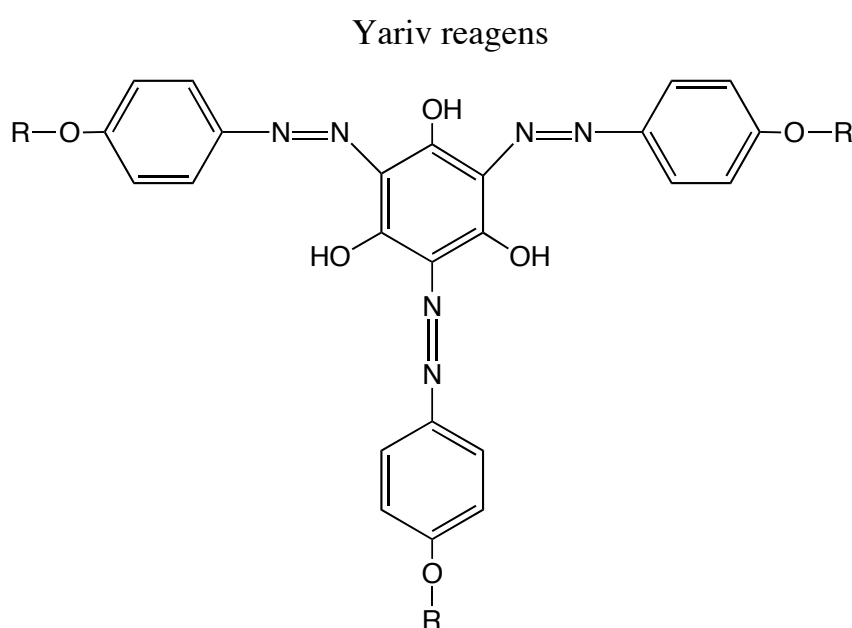
- A. Prøvene ble injisert på GC-MS apparatet
- B. Massespektrometer ble tatt opp og analysert

## 6.6.2 Innhold av arabinogalaktan II - Yariv Reagent System

(Biosupplies)

### Prinsipp

Yariv reagens (figur 6-16) er et rødt fargestoff som spesifikt binder arabinogalaktan proteiner (AGPs) og produktet felles ut. Mekanismen bak hvordan denne bindingen skjer er ikke fullstendig klarlagt. Yariv reagens benyttes ofte til spesifikt å lokalisere distribusjonen av AGPs, og metoden egner seg godt for å undersøke om polysakkaridene inneholder arabinogalaktan proteinstrukturer. (Tang *et al.*, 2006)



Figur 6-16. Yariv reagens.

### Prøver

Følgende prøver ble testet i denne metoden (se figur 3-1):

- 50%RÅ, 50%S1, 50%S2, 50%S3, 50%S4 og 50%S5
- 50vRÅ, 50vS1, 50vS2, 50vS3, 50vS4 og 50vS5
- 100vRÅ, 100vB<sub>1</sub>S1, 100vB<sub>1</sub>S2, 100vB<sub>1</sub>S3, 100vB<sub>1</sub>S4, 100vB<sub>1</sub>S5, 100vB<sub>2</sub>S1, 100vB<sub>2</sub>S2, 100vB<sub>2</sub>S3, 100vB<sub>2</sub>S4 og 100vB<sub>2</sub>S5

Alle prøvene var løst i vann, med konsentrasjoner 8 mg/ml.

## Reagenser

Standardløsning	Arabisk gummi ( <i>Acacia gum</i> ) 1 mg/ml
Yariv reagens	$\beta$ -glukosyl Yariv [1,3,5-tris (4- $\beta$ -D-glucopyranosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxy-benzene] 2 mg/ml
Gelblanding (pr plate):	35 mg agarosepulver 30 mg NaCl 0,7 mg NaN <sub>3</sub> 3,5 ml destillert vann

## Utstyr

Gelbondfilm for agarose (GE Healthcare)

Kokeplate

Glassrør

Vater

Jern til å lage hull, med vannsug

Finnpippetter

Plastkar

Whatman filterpapir

Cellestoff

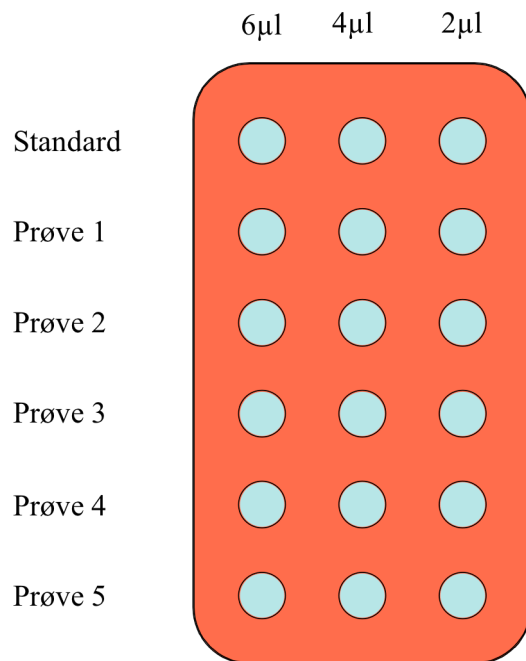
## Prosedyre

### Tilbereding av plater og påsetting av prøver (figur 6-17)

- Gelbondfilm for agarose ble klippet ut til 5x7 cm store plater
- Gelblandingen ble veid ut i glassrør og varmes opp til kokepunktet
- 50  $\mu$ l Yariv reagens ble tilsatt glassrøret og det ble blandet raskt
- Blandingen ble helt ut over den hydrofile siden av platen, mens platen lå i vater
- Da gelen hadde stivnet ble det laget små brønner ved hjelp av vannsug
- 2  $\mu$ l, 4  $\mu$ l og 6  $\mu$ l av standarden ble tilsatt i hver sin brønn (positiv kontroll)
- 2  $\mu$ l, 4  $\mu$ l og 6  $\mu$ l av hver prøve ble tilsatt i hver sin brønn
- Fuktet filterpapir ble lagt i bunnen av et kar, platen ble lagt i karet, og karet ble lukket
- Etter ca 24 timer ble gelen sjekket, og dersom det var røde ringer rundt brønnene var platene klare til pressing

**Pressing av plater**

- A. Platene ble lagt på en glassplate med gelen opp
- B. Et stykke Whatman papir, stort nok til å dekke gelen ble klippet ut og fuktet, og dermed lagt over gelen
- C. Ca 10 ark med cellepapir ble brettet dobbelt og lagt over whatmanpapiret, og en glassplate ble lagt på toppen
- D. En flaske med 2,5 liter vann ble plassert på glassplaten i 10 minutter, deretter ble cellepapiret snudd, og flasken ble plassert på glassplaten i nye 10 minutter
- E. Etter at all gelen hadde trukket inn i whatmanpapiret/cellepapiret ble platene scannet, og diameteren av ringene ble målt med linjal



Figur 6-17. Oppsett for brønner i gelbondflim.

## 7. Resultater

### 7.1 Ekstraksjon av svarthyllbær

Utgangsmaterialet var 500 g tørkede økologiske bær fra svarthyll. For å få en homogen blanding, og for å få tilgang på forbindelser i alle deler av bærene (frø, skall og fruktkjøtt) var det ønskelig å pulverisere bærene. Bærene var seige, og dermed vanskelige å knuse. For å gjøre pulveriseringen av bærene lettere ble de ekstrahert med diklormetan. Dette fjernet de mest upolare og fettløselige stoffene. Bærmaterialet ble deretter ekstrahert med 96 % etanol, der lavmolekylære og fenoliske forbindelser ekstraheres ut, i tillegg til at noe av vannet trekkes ut. 96 % etanolekstraktet ble tatt vare på, på grunn av forventet aktivitet fra innholdsstoffene. Bærmaterialet ble deretter tørket og pulverisert, og var dermed klargjort for videre ekstrahering.

Pulverisert bærmateriale ble ekstrahert videre med 96 % etanol, og dette ekstraktet ble slått sammen 96 % etanolekstraktet fra før pulveriseringen. Videre ekstraksjon med 50 % etanol trekker ut noe mer polare forbindelser. Ved vannekstraksjon ved 50 °C og 100 °C trekkes ulike vannløselig forbindelser ut. Sure polysakkarider kan ofte ekstraheres fra plantecelleveggen med oppvarmet vann, men endel nøytrale polysakkarider kan være vanskelig å ekstrahere fra plantecelleveggen på denne måten. Ofte benyttes basiske løsninger for ekstraksjon av forskjellige typer hemicellulose.

De ulike ekstraksjonene resulterte i følgende råekstrakter:

- 96 % etanolekstrakt: svart farge, ca 3 liter. Ekstraktet fikk navnet 96%RÅ.
- 50 % etanolekstrakt: mørk brun farge, ca 15 liter. Ekstraktet ble kalt 50%RÅ.
- 50 °C vannekstrakt: gul-brun farge, ca 4 liter. Dette ekstraktet ble kalt 50vRÅ.
- 100 °C vannekstrakt: gul-brun farge, ca 3 liter. Ekstraktet fikk navnet 100vRÅ.

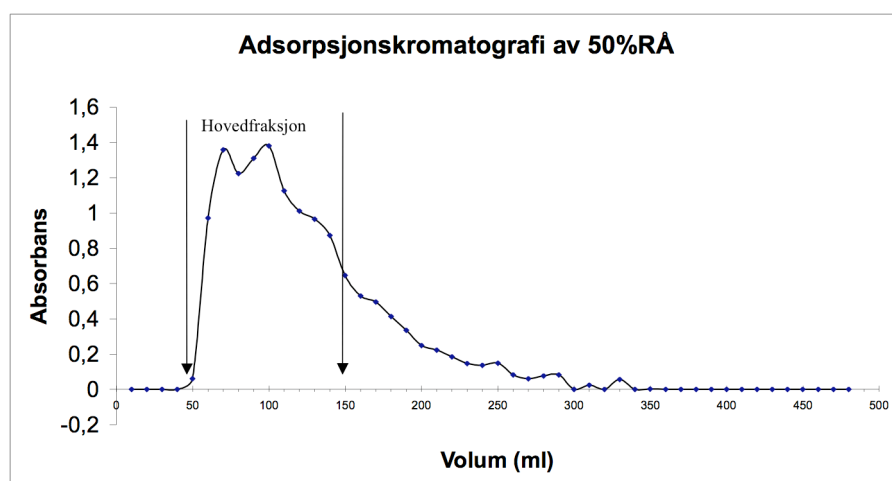
Ettersom bærmaterialet var veldig finpulverisert måtte ekstraktene sentrifugeres for å skille bærmateriale fra ekstrakt. Deretter ble ekstraktene filtrert med glassmikrofiberfilter og vannsug (metode 6.1.4), og inndampet (metode 6.1.3).

## 7.2 Isolering og opprensning av polysakkarider

Råekstraktene inneholder en blanding av sure og nøytrale lavmolekylære, intermediærmolekylære og høymolekylære polysakkarider, i tillegg til en rekke andre forbindelser, blant annet endel fenoliske forbindelser. Ekstraktene fra 50 % etanol-, 50 °C vann- og 100 °C vannekstraksjonene ble rensset og fraksjonert på bakgrunn av størrelse og ladning. Etter hver kolonneeluering med Amberlite XAD-7, Bio-Gel® P-6 og ANX Sepharose ble karbohydratinnhold i fraksjonene testet med fenolssvovelsyretesten (metode 6.1.7). Det ble laget karbohydratprofiler, og ut i fra disse ble det avgjort hvilke fraksjoner som skulle videre renses og undersøkes. Isolering- og opprensningsprosessene resulterte i 30 fraksjoner. En oversikt over disse fraksjonene er vist i figur 3-1.

### 7.2.1 Adsorpsjonskromatografi med Amberlite XAD-7 HP

Ved å benytte adsorpsjonskromatografi vil ulike forbindelser i en prøve separeres på bakgrunn av forskjellig affinitet til stasjonærfasen. De forbindelsene som har lavest affinitet elueres raskere gjennom kolonnen enn de med høyere affinitet (Sirnes, 2003). Denne metoden ble kun benyttet på 50 % etanol råekstraktet (50%RÅ), ettersom dette ekstraktet inneholdt mest fargestoffer. Det ble benyttet destillert vann som mobilfase for å eluere ut polysakkaridene. Upolare og hydrofobe forbindelser adsorberes til stasjonærfasen, og elueres ut med metanol, eventuelt metanol tilsatt trifluoreddiksyre (TFA).

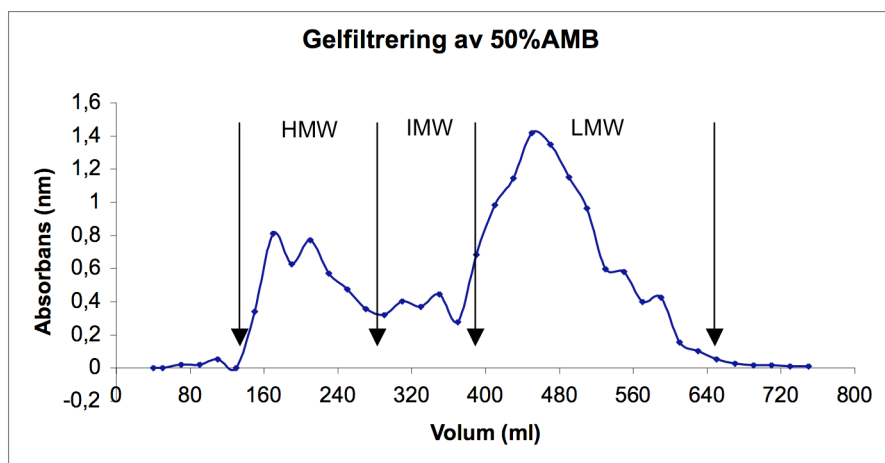


Figur 7-1 Adsorpsjonskromatografi med Amberlite XAD-7. 50 % etanol råekstraktet ble eluert med vann, og hovedfraksjonen (50%AMB) ble isolert.

50vRÅ ble eluert med vann. Hovedfraksjonen ble isolert slik figur 7-1 viser, og denne fraksjonen ble kalt 50%AMB. Mye av fargestoffene ble deretter eluert med metanol, og dette metanolekstraktet ble kalt 50%MET.

### 7.2.2 Gelfiltrering med Bio-Gel® P-6

Gelfiltrering separerer stoffer etter molekylstørrelse. Elueringen med standardene raffinose og dextran T500 ( $M_w \sim 500\,000$ ) ga grunnlinjeseparasjon noe som viste at kolonnen separerte tilfredsstillende. Gelfiltrering ble utført på rækstraktene fra 50 °C vann ekstraksjonen (50vRÅ) og 100 °C vann ekstraksjonen (100vRÅ), samt den første fraksjonen isolert etter rensing på Amberlite XAD (50%AMB).



*Figur 7-2 Karbohydratprofil etter gelfiltrering av 50%AMB. Gelfiltreringen resulterte i 3 fraksjoner: HMW, IMW og LMW. Den første fraksjonen inneholder høymolekylære polysakkarider (HMW), og ble kalt 50vB.*

Gelfiltrering av 50%AMB resulterte i tre karbohydratfraksjoner (figur 7-2). Den første fraksjonen inneholdt mest høymolekylære polysakkarider, og ble kalt 50%B. Gelfiltrering av 50vRÅ resulterte også i 3 karbohydratfraksjoner. Den første fraksjonen ble kalt 50vB, og denne inneholdt mest høymolekylære polysakkarider. Gelfiltrering av 100vRÅ resulterte i fire fraksjoner. De to første fraksjonene ble eluert ut såpass tidlig at de begge sannsynligvis inneholder høymolekylære polysakkarider. Fraksjonene ble kalt 100vB<sub>1</sub> og 100vB<sub>2</sub>. På grunn av en feil ble ikke 100vB<sub>1</sub> tatt vare på, og er dermed ikke videre undersøkt.

### 7.2.3 Ionebytterkromatografi med ANX sepharose

Ionebytterkromatografi baseres på utveksling av ioner mellom en fast stasjonærfase og en mobilfase i løsning (metode 6.3.3). På denne måten skilles nøytrale og sure polysakkarider, i tillegg til at de sure polysakkaridene skilles fra hverandre etter ladningsstyrke. De nøytrale polysakkaridene ble eluert ut med destillert vann. Disse ble ikke videre undersøkt. For å eluere ut de sure polysakkaridene og separere disse etter ladning ble det utført en gradienteluering med NaCl (0-2 M) av hver fraksjon fra gelfiltreringen (50%B, 50vB, 100vB<sub>1</sub> og 100vB<sub>2</sub>). Hver eluering resulterte i fem fraksjoner (S1-S5).

## 7.3 Biologisk aktivitet

De ulike fraksjonene ble testet for biologisk aktivitet og monosakkaridsammensetning. De fraksjonene med høyest biologisk aktivitet ble tatt ut for videre strukturell analyse. Dette ble gjort ettersom oppresning og fraksjonering ga mange fraksjoner, og grunnet tidspress. Det mest ideelle ville vært å analysere alle fraksjonene i alle testsystemer.

### 7.3.1 Komplementfikserende aktivitet

Alle polysakkaridfraksjonene isolert fra svarthyllbær ble testet for komplementfikserende aktivitet, med unntak av 50%MET og 50%AMB (se figur 3-1). Med komplementfikserende aktivitet menes den påvirkning polysakkarider har på komplement i immunsystemet. Testen utføres ved å undersøke i hvilken grad en forbindelse kan hemme hemolyse, og resultatene oppgis i % hemming av hemolyse. Det ble laget plot med % hemming av lyse mot logaritmisk konsentrasjon av fraksjonene (µg/ml). For hver prøve ble også IC<sub>50</sub> verdien beregnet. IC<sub>50</sub>-verdien er den laveste konsentrasjonen som er nødvendig for at 50% av blodcellene skal hemolyseres. For å korrigere for variasjoner og operatørfeil ble det benyttet en standard med komplementfikserende aktivitet, PMII, som er et pektintype polysakkarid med arabino-3,6-galaktan, isolert fra bladene til *Plantago Major* (Yamada & Kiyohara, 1999).

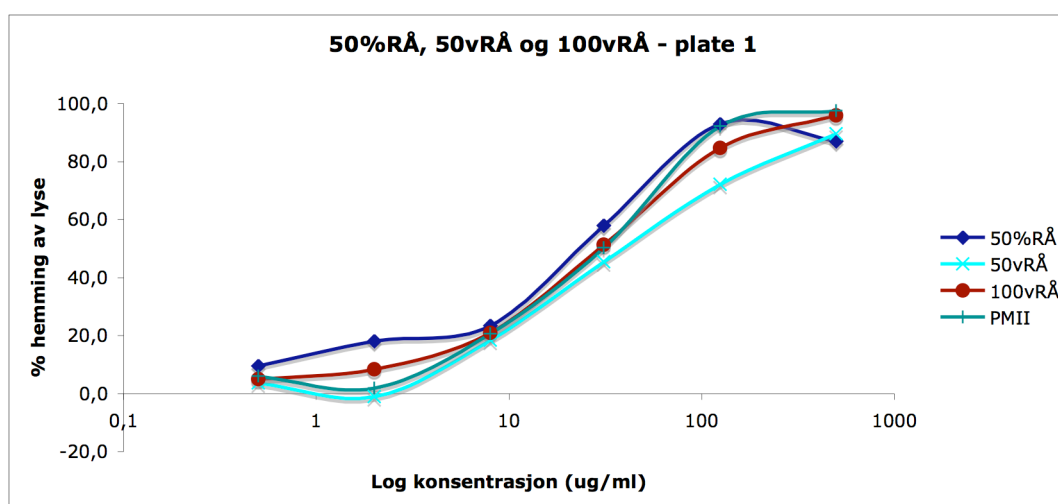


## Tolkning og diskusjon av resultatene

### Komplementfikseringsplot

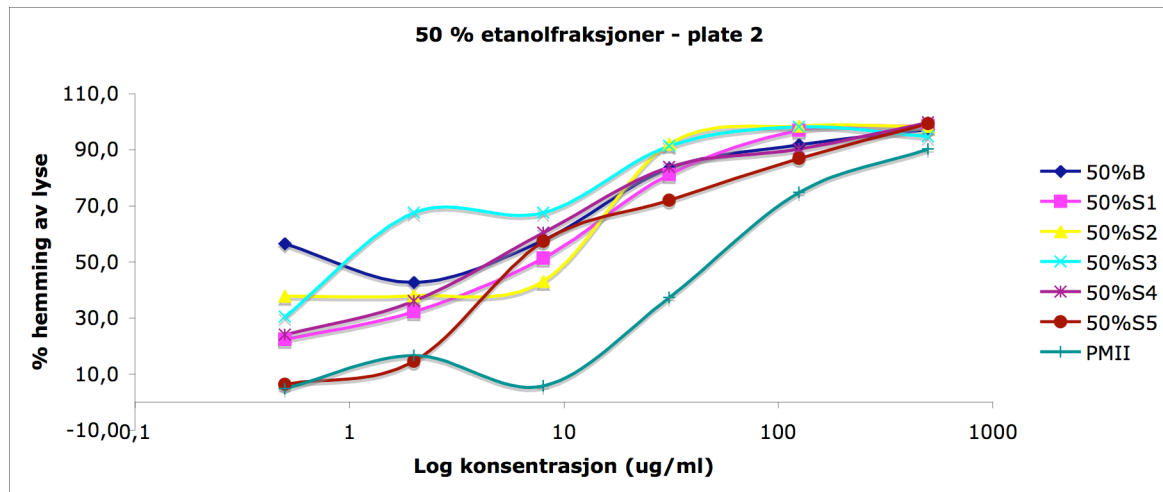
Ved å se på plot av % hemming av hemolyse mot logaritmisk konsentrasjon av hver fraksjon, kan det trekkes konklusjoner om komplementfikserende evne i forhold til PMII på den enkelte platen. Høy % hemolyse betyr god komplementfikserende aktivitet. Det er likevel vanskelig å sammenligne resultater fra forskjellige plater, ettersom det ofte observeres noen dag-til-dag forskjeller når en benytter biologiske testsystemer.

Komplementfikseringsplotene viser at alle polysakkaridfraksjonene fra svarthyllbær har komplementfikserende aktivitet, og at flere har høyere aktivitet enn PMII. Resultatene indikerer også at de høymolekylære polysakkaridfraksjonene har høyere aktivitet enn rækstraktene. Fraksjonene med høyest komplementfikserende aktivitet ser ut til å være 50%B, 50%S1-S5, 50vS1-S2 og 100vB<sub>1</sub>S1-S3. Under følger en diskusjon av resultatene fra de ulike plotene.



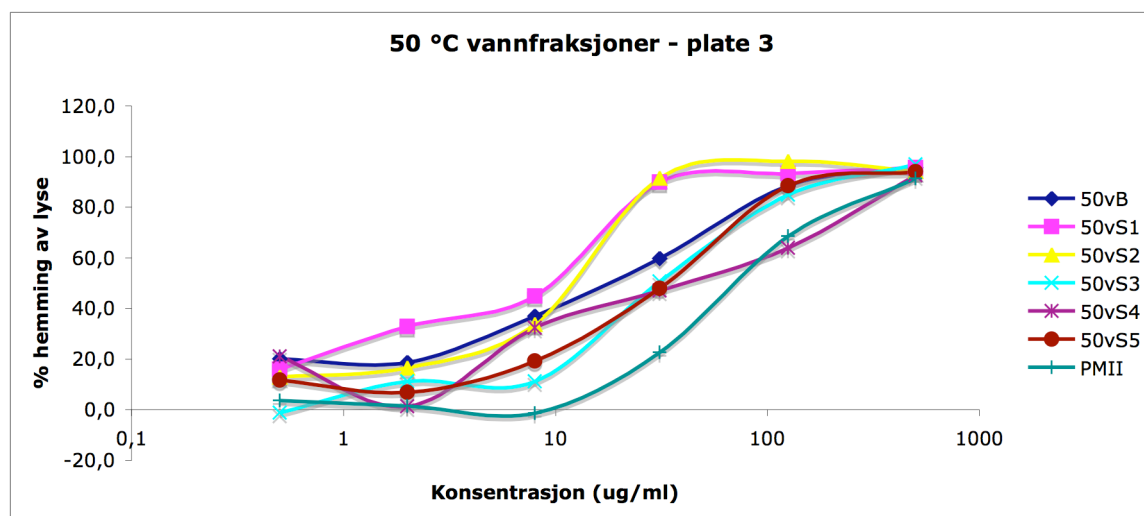
Figur 7-3 Rækstraktenes komplementfikserende aktivitet, sammenlignet med PMII.

Slik figur 7-3 viser er det ikke store forskjeller mellom aktiviteten til rækstraktene. Det ser likevel ut til at rækstraktet fra 50 % etanolekstraksjonen (50%RÅ) har størst aktivitet, tett etterfulgt av PMII og rækstraktet fra 100 °C vannekstraksjonen. 50vRÅ ser ut til å ha lavest aktivitet.



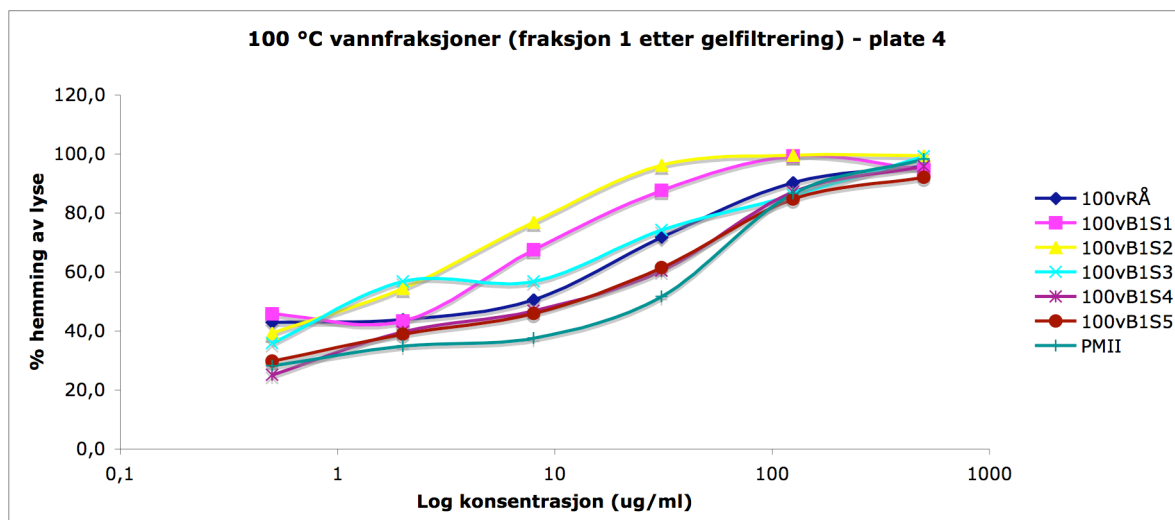
Figur 7-4 Resultatene fra 50 % etanolfraksjonene, sammenlignet med PMII.

Figur 7-4 viser resultatene for fraksjonene fra 50 % etanolekstraksjonen. Plotet viser at alle fraksjonene har bedre aktivitet enn PMII. 50%S2 og 50%S3 ser ut til å ha litt større komplementfikserende aktivitet enn de andre fraksjonene.

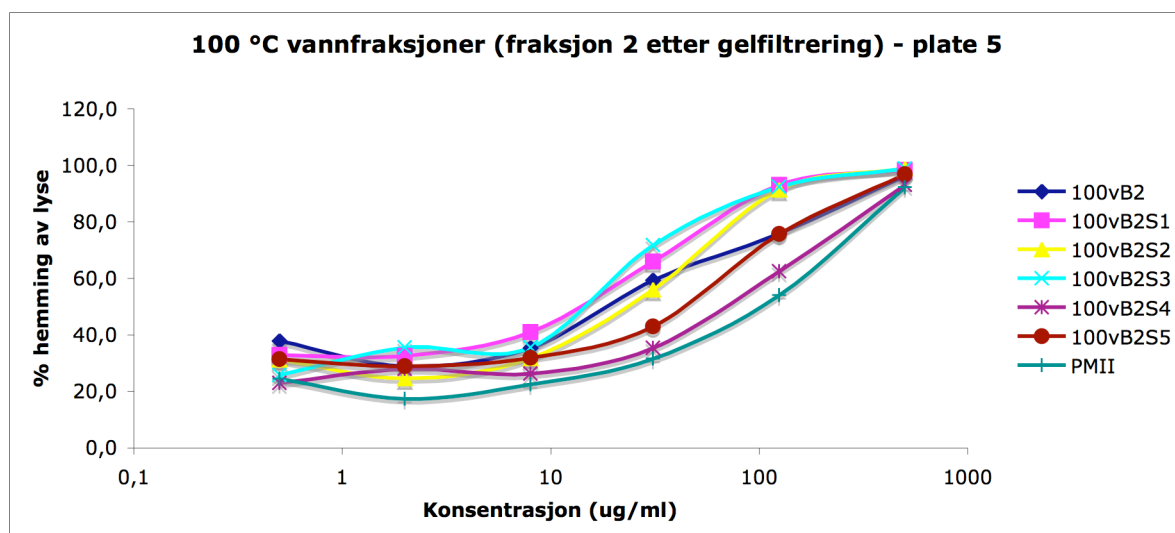


Figur 7-5 Komplementfikseringsplot for fraksjonene fra 50 °C vannekstraksjonen, sammenlignet med PMII.

Ut i fra plotet vist i figur 7-5 har alle fraksjonene fra 50 °C vannekstraksjonen større komplementfikserende aktivitet enn PMII. Resultatene tyder også på at 50vS1 og 50vS2 har høyere komplementfikserende aktivitet enn 50vS3-S5, og dette kan bety at ladningsstyrken spiller en rolle for aktiviteten ettersom 50vS1 og S2 har mindre ladningsstyrke enn 50S3-S5.



Figur 7-6 Komplementfikseringstest av 100 °C vannfraksjoner fra gelfiltreringsfraksjon 1 (B<sub>1</sub>).

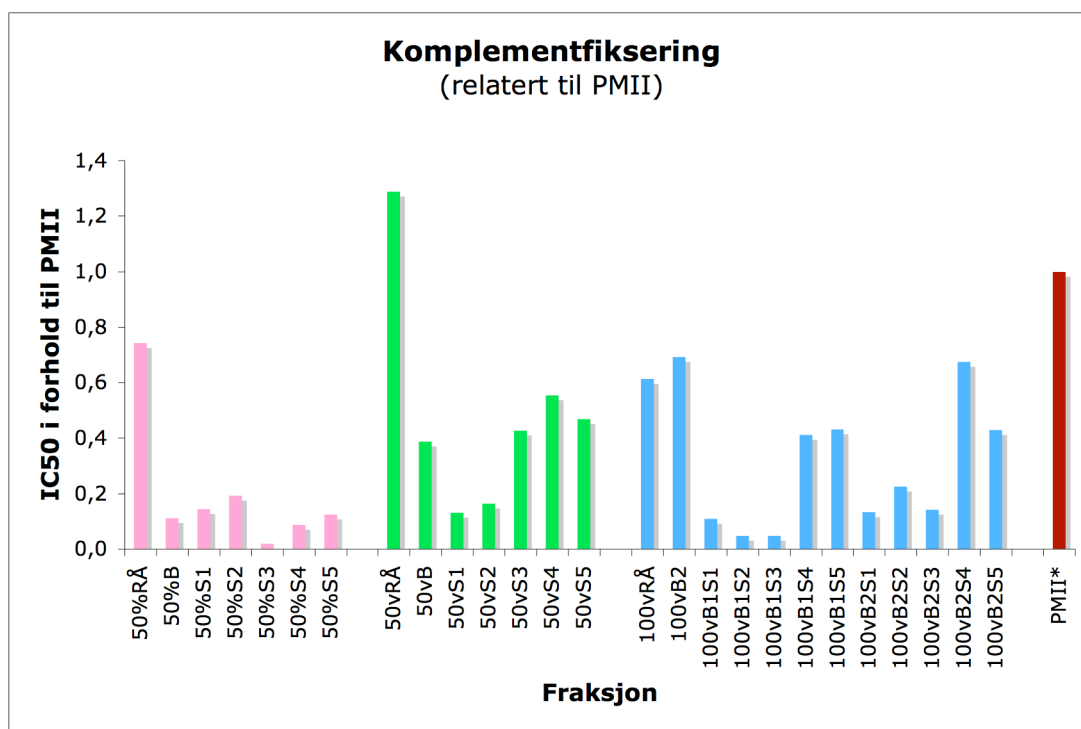


Figur 7-7 Komplementfikseringsplot for 100 °C vannfraksjoner fra gelfiltreringsfraksjon 2 (B<sub>2</sub>).

Resultatene for 100 °C vannfraksjonene er vist i figurene 7-6 og 7-7. Figur 7-6 viser ionebytterfraksjonene etter gelfiltreringsfraksjon 1 (B<sub>1</sub>), og 100vB<sub>1</sub>S1-S2 ser ut til å ha høyest komplementfikserende aktivitet av disse fraksjonene. Figur 7-7 viser resultatene fra ionebytterfraksjonene etter gelfiltreringsfraksjon 2 (B<sub>2</sub>), og det ser ut til at det er 100vB<sub>2</sub>S1-S3 som har høyest aktivitet av disse. Resultatene indikerer at alle fraksjonene fra 100 °C vannekstraksjonen har større aktivitet enn PMII.

### IC<sub>50</sub> verdier

En enklere måte å sammenligne resultatene på er å beregne konsentrasjonen som må til for at 50 % av cellene skal lysere (IC<sub>50</sub> verdien). Resultatene er presentert i figur 7-8. Den gjennomsnittlige IC<sub>50</sub> konsentrasjonen til PMII var 55 µg/ml, og denne er satt lik 1. Alle fraksjonenes IC<sub>50</sub> verdi er i forhold til denne, og dermed kan resultater fra ulike plater sammenlignes. Verdier under 1 betyr at fraksjonen hemmer 50 % av blodcellene ved lavere konsentrasjoner enn 55 µg/ml, og dermed har høyere komplementfikseringsaktivitet enn PMII. Dersom % hemming ikke øker proporsjonalt med konsentrasjon kan IC<sub>50</sub> verdien mistolkes, ettersom IC<sub>50</sub> verdien bare tar utgangspunkt i ett punkt på kurven. Dermed må man være forsiktig med å trekke direkte konklusjoner ut i fra IC<sub>50</sub> verdiene alene.



Figur 7-8 IC<sub>50</sub> verdiene fra de ulike fraksjonene er relatert til PMII verdien fra den enkelte platen. Høye stolper betyr lavere aktivitet enn PMII, ettersom det må høyere konsentrasjon til for å hemme lyseringen. Lave stolper betyr høyere aktivitet, ettersom 50 % av cellene lyseres ved lavere konsentrasjoner. \*Gjennomsnittelig IC<sub>50</sub> verdi fra PMII er satt til 1.

Ut i fra fraksjonenes IC<sub>50</sub> verdier ser det ut til at alle, med unntak av 50vRÅ, har større komplementfikserende aktivitet enn PMII, og dette stemmer med komplementfikseringsplotene diskutert over. Det ser ut til at 50%B, 50%S1-S5, 50vS1-S2 og 100vB<sub>1</sub>S1-S3 har høyest aktivitet av alle fraksjonene, og IC<sub>50</sub> verdiene for disse er under 0,2. Dette betyr at 50% av blodcellene lyseres ved konsentrasjoner under 10 µg/ml. Felles for disse fraksjonene er at de inneholder høymolekylære polysakkarider. Det må høyere

konsentrasjoner av råekstraktene til for å hemme 50% av hemolysen i forhold til ionebytterfraksjonene (S1-S5), noe som tyder på at konsentrerte og rene høymolekylære polysakkaridfraksjoner har høyere komplementfikserende aktivitet enn fraksjoner som også inneholder lavmolekylære polysakkarider og fenoliske forbindelser. Det kan se ut til at ladningsstyrken har en liten betydning for den komplementfikserende aktiviteten, ettersom  $IC_{50}$  verdien for S1-S3 fra alle ekstraksjonene ser ut til å være lavere enn for S4 og S5.

### ***Usikkerhet/feilkilder***

Det er mange trinn i denne metoden, og dette gir mange muligheter til å gjøre feil. Forsøkene ble utført ved 2 besøk på Folkehelseinstituttet, og selv om blodcellene kom fra samme sau, var de tappet på ulike datoer. Titreingskurvene og lyseringsgradene ble ulike, og dette bidrar til usikkerhet når forsøk fra de to besøkene skal sammenlignes. Lyseringsgradene for hver plate var i alle tilfeller innenfor anbefalt lyseringsgrad (30-70 %). Det ble utført 2 paralleller av alle fortynningene, og gjennomsnittet av parallellene ble benyttet. PMII er benyttet som standard på hver plate, og resultatene ble relatert til PMII på den enkelt platen. Dermed tas det høyde for blant annet fortynning- og pipetteringsfeil, dag-til-dag variasjoner, i tillegg til at resultatene fra de ulike forsøkene kan sammenlignes.

Ettersom alle fraksjonene fra de tre ekstraktene viser markant påvirkning på komplementsystemet, i tillegg til at de fleste er bedre enn PMII, er påvirkning på komplement fra polysakkarider fra svarthyllbær et meget spennende felt for fremtidig forskning. Det er behov for flere forsøk som kan bekrefte resultatene i denne studien.

### **7.3.2 Antimikrobiell effekt**

Når bakterier eller sopp dyrkes på agarskåler, og det tilsettes testforbindelser som hemmer veksten eller dreper den enkelte bakterien/soppen, vil det dannes hemmingssoner rundt punktene der testfraksjonene ble tilsatt. Ved å sammenligne resultatene med hemmingssonene til en positiv kontroll fås en indikasjon på grad av veksthemming, og dermed på testfraksjonenes antimikrobielle effekt.

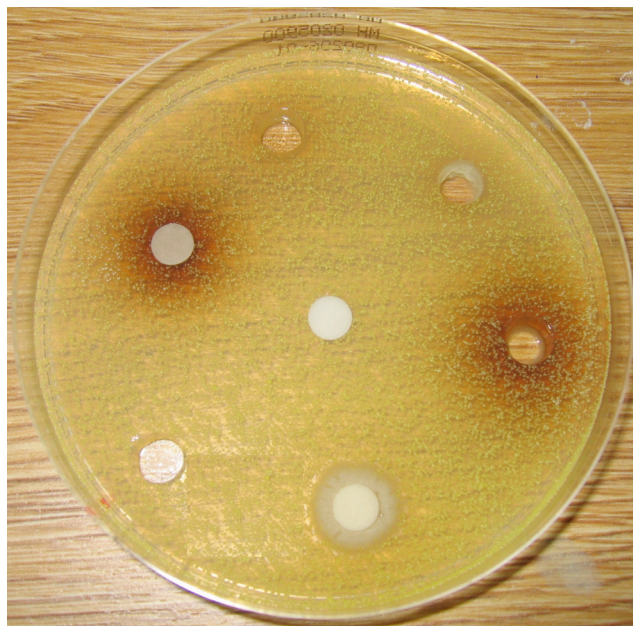
Fraksjonene 96%RÅ, 50 %MET, 50%RÅ, 50%B, 50vRÅ, 50vB, 100vRÅ og 100vB<sub>2</sub> ble testet for effekt mot *Kokurus rhizinophilia* (bakterie), *Bacillus subtilis* (bakterie), *Eschericia coli* (bakterie), *Pseudomonas aeruginosa* (bakterie), *Staphylococcus aureus* (bakterie) og

*Candida albicans* (sopp). 96%RÅ og 50%MET inneholder fenoliske forbindelser.

Puupponen-Pimiä et al. (2001) har undersøkt fenoliske forbindelser fra bærekstrakter, og funnet ut at disse hemmer vekst av ulike bakterier (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001). Det ble dermed benyttet to paralleller av 96%RÅ og 50%MET. Som positiv kontroll for *Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Staphylococcus aureus* ble en standardløsning med gentamicin benyttet. Som positiv kontroll for *Candida albicans* ble en standardløsning med sulconazol benyttet. En standardløsning med kloramfenikol skulle vært benyttet mot *Kokurus rhizinophilia* og *Bacillus subtilis*, men på grunn av en feil ble ikke denne benyttet. Metanol ble benyttet som negativ kontroll for alle mikroorganismene.

### Diskusjon og tolkning av resultatene

Diameteren på brønnene og på filterpapirene var henholdsvis 7 og 9 mm. Resultatene fra forsøket ble avlest ved å måle diameteren på hemmingssonene med linjal, og fra denne verdien ble diameteren på brønnen/filterpapiret trukket fra. Bilde 7-1 viser et eksempel på et resultat på en av skålene.



**Bilde 7- 1 Eksempel på resultat fra antimikrobielt forsøk.**

*K. rhizophilia*: Det ble observert redusert vekst av bakterien rundt påsettingspunkter for 50%B (4 mm) og 50vB (4 mm). Ingen positiv kontroll ble benyttet.

*B. subtilis*: Det ble observert redusert vekst av bakterien rundt påsettingspunktet for 50%MET (4 mm) og 50%RÅ (2 mm). Ingen positiv kontroll ble benyttet.

*C. albicans*: Redusert vekst ble observert rundt punktene for 50%RÅ (1 mm), 50%B, 50vRÅ (1 mm) og 100vRÅ (1 mm). Det ble observert 12 mm hemmingssone rundt punktet der sulconazol var påsatt.

Ingen tegn til hemming eller redusert vekst av *E. coli*, *S. aureus* eller *P. aeruginosa* ble observert. Standardløsningen med gentamicin viste forøvrig god veksthemming (19 mm).

De observasjonene som ble gjort viste ingen klare vekstfrie hemmingssoner rundt punktene der testforbindelsene ble påsatt, og det kan dermed ikke trekkes direkte konklusjoner ut i fra forsøket. Resultatene tyder likevel på at fraksjonene fra svarthyllbær er bakteriostatiske, på grunn av den reduserte veksten som ble observert. Ettersom det ikke ble benyttet noen positiv kontroll er det vanskelig å si noe om hvor høy denne aktiviteten er. Det er behov for flere studier som kan bekrefte funnene i dette forsøket.

### *Usikkerhet/feilkilder*

Prøveekstraktene som skulle påsettes filterpapir ville ikke trekke inn i papiret, og dermed var det vanskelig å sette på korrekt mengde. Det ble besluttet at halvparten av mengden som skulle settes på ble tilført på hver sin side av filterpapiret, slik at riktig mengde prøve ble satt på filterpapirene.

### **7.3.3 Påvirkning på CYP3A4 + b5 – metabolisme av midazolam**

Dette forsøket på CYP-påvirkning av polysakkarider fra bær, var basert på en metode utviklet av Lillian Våge Postvoll. I den opprinnelige metoden er det ikke benyttet prøver med polysakkarider. Forsøket stoppes med iskald acetonitril før prøven dampes av, løses i mobilfase og injiseres på LC-MS (Postvoll, 2006). Svarthyllbærfraksjonene inneholder høymolekylære polysakkarider, og disse forbindelsene kan karamelliseres i LC-kolonnen og dermed ødelegge apparaturen. For å hindre dette ble det innført et trinn i metoden der testfraksjonene ble ekstrahert med iskald etylacetat. Denne ekstraksjonen stopper forsøket, samtidig som midazolam, metabolittene og kontrollene ekstraheres over i etylacetaten mens vannløselige forbindelser, som polysakkarider, forblir i vannfasen.

1'-OH og 4-OH er hovedmetabolittene som dannes når midazolam utsettes for CYP3A4. Det dannes mer 1'-OH enn 4-OH. Diazepam er tilsatt som intern standard, slik at metabolitt-toppene som detekteres med massespektrometeret kan relateres til diazepam (DIA)-toppen.

DIA-toppen skal være tilnærmet konstant i alle forsøkene. Forholdet mellom metabolittene og DIA-toppen i prøvene sammenlignes med en positiv kontroll (P) med midazolam og CYP3A4. Fraksjonene som ble undersøkt var råekstraktene fra ekstraksjonene med 96 % etanol (96%RÅ), 50 % etanol (50%RÅ), 50 °C vann (50vRÅ) og 100 °C vann (100vRÅ), i tillegg til metanolekstraktet fra adsorpsjonskromatografi av 50 % etanolekstraktet (50%MET) og 50 % etanolfraksjonen etter gelfiltrering (50%B).

### *Tolkning og diskusjon av resultatene*

Resultatene fra forsøket er presentert i tabell 7-1. Ved normal metabolisering av midazolam (positiv kontroll), dannes en gitt mengde 1'-OH og 4-OH. Denne mengden er satt lik 100. Dersom CYP3A4 påvirkes når en testfraksjon tilsettes vil mengden metabolitter endre seg. Verdiene i tabellen viser hvor mye metabolitter som er dannet med testfraksjonene tilstede, i forhold til den positive kontrollen. Verdier under 100 tyder på at en mindre mengde metabolitt er dannet (hemmet metabolisme), mens verdier over 100 betyr at en større mengde metabolitt er dannet (stimulert metabolisme).

	1'-OH/DIA (topphøydeforhold)	4-OH/DIA (topphøydeforhold)
P	100	100
96%RÅ	30	30
50%MET	20	20
50%RÅ	140	140
50%B	160	140
50vRÅ	170	160
100vRÅ	150	140

*Tabell 7- 1 Forholdet mellom metabolittene og positiv kontroll, der toppforholdene i den positive kontrollen er satt til 100.*

Resultatene tyder på at det dannes mer 1'-OH enn 4-OH, og dette er i tråd med tidligere studier (Postvoll, 2006). Mindre mengder metabolitter dannes når 96%RÅ og 50%MET er tilstede, henholdsvis 30 og 20 i forhold til 100 i den positive kontrollen. Dette tyder på en CYP3A4-hemming på 70 % for 96%RÅ og 80 % for 50%MET. Disse prøvene har kraftig farge og inneholder en del lavmolekylære og fenoliske forbindelser.



Noe overraskende er det at fraksjonene 50%RÅ, 50%B, 50vRÅ og 100vRÅ har verdier over 100, noe som kan tyde på en økning i mengden metabolitt dannet i forhold til den positive kontrollen. Dette kan bety at CYP3A4 stimuleres til å omdanne mer midazolam til 1'-OH og 4-OH metabolitter. Fraksjonene som ser ut til å stimulere denne metabolismen inneholder en blanding av høymolekylære og lavmolekylære polysakkarider fra svarthyllbær, både sure og nøytrale. Det er ikke tidligere gjort studier av slike forbindelsers påvirkning av påvirkning av CYP-enzymet. Økningen i omdannelse til metabolitter ligger mellom 40 og 70 %, og det er 50vRÅ som ser ut til å ha kraftigst evne til å stimulere CYP3A4-enzymet.

Det kan tenkes å være mange grunner til endret midazolam-metabolisme i dette forsøket. CYP-hemming kan forekomme ved at en forbindelse binder og inaktiverer CYP-enzymet, eller dersom forbindelsen okkuperer CYP-enzymets bindingssete for midazolam, slik at enzymet ikke får utøvet sin effekt. Stimulering av CYP-aktivitet derimot skjer oftest ved øket eller endret DNA transkripsjon, en prosess som tar flere dager. Midazolam-forsøket er gjort på en dag, og det er ingen gener tilstede i systemet. Årsaken til stimuleringen observert her er derfor vanskelig å forklare. En teori er at noen forbindelser i ekstraktene har en rask og direkte påvirkning av CYP-enzymet, muligens ved en allosterisk binding til enzymet som resulterer i konformasjonsendring (Christensen, 2008).

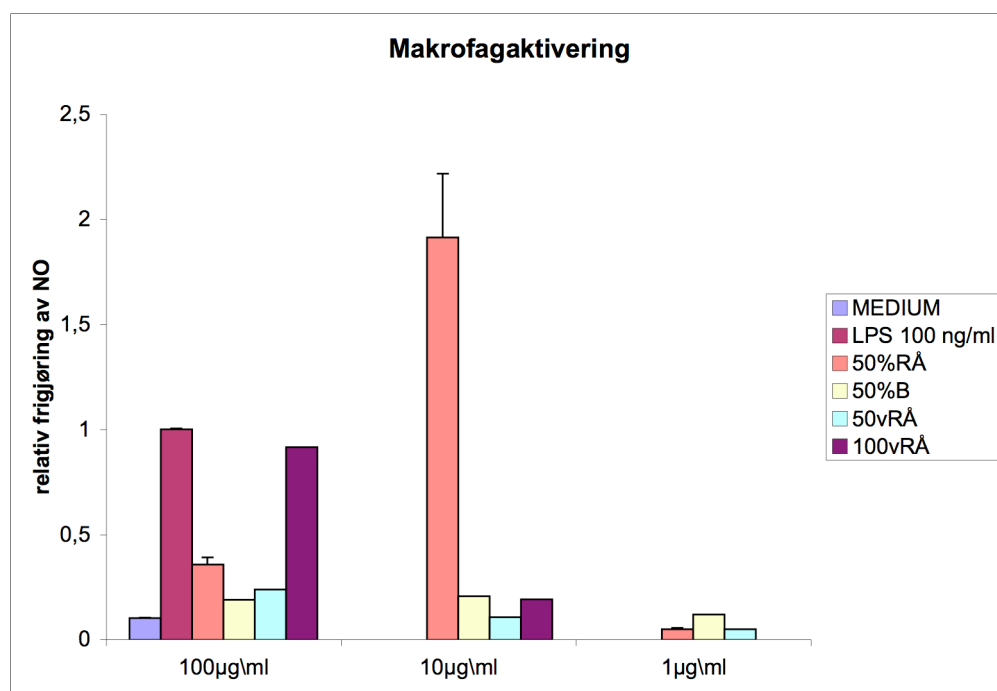
### *Usikkerhet/feilkilder*

Forsøket er et pilotforsøk av en ny metode utført uten paralleller, og det kan ikke trekkes bastante konklusjoner ut i fra resultatene. Ved å relatere resultatene til en positiv kontroll korrigeres det for tilfeldigheter og feil som kan oppstå underveis. Diazepam ble tilsatt mot slutten av forsøket som intern kontroll for å korrigere for dag-til-dag variasjoner på LC-MS.

Selv om forsøket er gjort uten paralleller er det likevel flere ting som tyder på at det ikke er tilfeldigheter som er årsaken til de oppsiktsvekkende resultatene. For eksempel er forholdet mellom 1'-OH og 4-OH likt alle testfraksjonene og kontrollen. Topphøydeforholdene i de to prøvene som hemmer CYP3A4 er like, i tillegg til at topphøydeforholdene i de fire prøvene som ser ut til å stimulere CYP3A4 er like. Det er forøvrig gjort lite forskning på polysakkarider fra planter, og deres påvirkning på cytokromsystemet, men dette forsøket viser at det utvilsomt er et spennende felt med behov for videre undersøkelser.

### 7.3.4 Makrofagaktivering

Ved aktivering av makrofager skilles flere mediatorer ut, blant annet nitrogenoksid (NO). NO brytes raskt ned til det stabile produktet nitritt ( $\text{NO}^2^-$ ), og kan påvises ved hjelp av Griess Reagent System (metode 6.4.4). Måling av NO-frigjøring gir en indikasjon på hvor effektive ulike testfraksjoner er til å aktivere makrofager. Måling av NO-frigjøring er utført på råekstraktene fra ekstraksjonene med 50 % etanol (50%RÅ) 50 °C vann (50vRÅ) og 100 °C vann (100vRÅ), samt 50 % etanolfraksjonen etter gelfiltrering (50%B). MEDIUM



Figur 7-9 NO-frigjøring ved ulike konsentrasjoner av svarthyllbærekstrakter.

#### Tolkning og diskusjon av resultatene

Figur 7-9 viser den relative frigjøringen av NO fra vev ved påvirkning av de ulike ekstraktene. Svarthyllbærekstraktene har NO-frigjørende aktivitet, men denne er mindre enn LPS-standard. Det ser ut til at 100vRÅ har doseavhengig NO-frigjørende evne, men det må benyttes forholdsvis høye konsentrasjoner av denne for å få samme relativ frigjøring som LPS-standard. Den store toppen for 50%RÅ ved konsentrasjonen 10 µg/ml ser ut til å representere en voldsom NO-frigjøring. Dersom dette resultatet stemmer burde en kunne se en ennå større, eller i det minste lik, relativ frigjøring av NO ved konsentrasjon 100 µg/ml for samme ekstraktet, men dette er ikke observert. Det er benyttet 3 paralleller av hver fortykning i forsøket, noe som tyder på at det ikke er tilfeldigheter som er årsaken til den

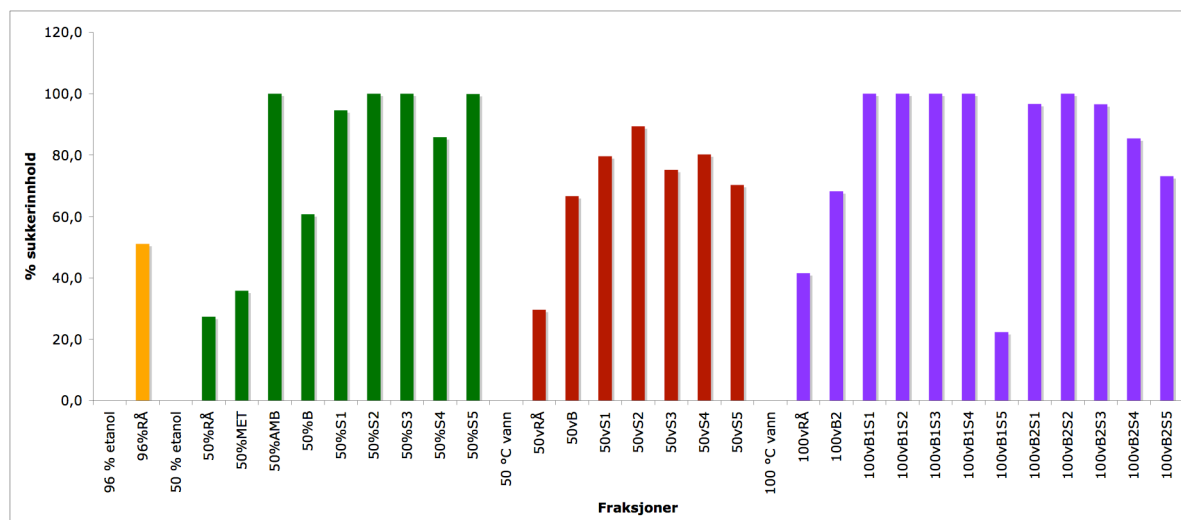
høye NO-frigjørende aktiviteten. En forklaring kan være at prøven ikke er tilstrekkelig oppløst ved konsentrasjon 100 µg/ml, og dermed vil responsen bli vesentlig dårligere enn ved fullstendig oppløsning. 50%B og 50vRÅ viser også noe NO-frigjørende aktivitet, og frigjøringen ser ut til å være doseavhengig. Aktiviteten er likevel mindre enn LPS-standard, og så vidt over mediets NO-frigjørende effekt. Likevel tyder det på økt NO-frigjøring, men det er behov for flere studier som kan bekrefte resultatene.

### *Usikkerhet/feilkilder*

Et gjennomsnitt av 3 paralleller av alle fraksjonene, noe som til en viss grad utelukker enkeltfeil i målinger og lignende. For å korrigere for mediets egen NO-frigjørende aktivitet, er denne tatt med som en negativ kontroll. Resultatene sammenlignes også med en positiv kontroll, slik at man lettere kan si noe om graden av NO-frigjøring.

## 7.4 Monosakkaridsammensetning

Ved å analysere metanolyseprøvene med GC kan monosakkaridsammensetningen bestemmes. De vanligste monosakkaridene som inngår i plantepolysakkarider er arabinose (ara), rhamnose (rha), fucose (fuc), xylose (xyl), mannose (man), galaktose (gal), glukose (glu), glukuronsyre (glcA) og galakturonsyre (galA). Hvert monosakkarid kan foreligge i flere konformasjoner, og dermed gir de opphav til flere topper i GC-kromatogrammet. Det er likevel et karakteristisk mønster for hvert monosakkarid med tanke på retensjonstidene til toppene og forholdene mellom topparealene. Monosakkaridsammensetningen ble undersøkt i alle fraksjonene, og det henvises til figur 3-1 for oversikt over fraksjonene. Figur 7-10 viser det totale sukkerinnholdet i hver fraksjon, mens fordelingen av monosakkarider i hver fraksjon er vist i tabell 7-2. Mannitol ble tilsatt som intern standard, og relativ retensjonstid for hvert monosakkarid ble beregnet ut i fra denne. Ved å benytte en standardkurve for hvert monosakkarid ble innholdet av hvert monosakkarid i prøvene beregnet.



Figur 7-10 Totalt sukkerinnhold i fraksjonene i forhold til total mengde prøve.

### Tolkning og diskusjon av resultatene

Det totale sukkerinnholdet i hver fraksjon varierer, men det ser ut til å være en viss økning i sukkerinnhold i tråd med rensingen og isoleringen, slik figur 7-10 viser. 96%RÅ og 50 °C vannfraksjonene ser ut til å inneholde noe mindre sukker enn 50 % etanolfraksjonene og 100 °C vannfraksjonene. De fleste av de sure fraksjonene ser ut til å inneholde mer enn 80 % sukker.

Resultatene fra monosakkaridsammensetningen, presentert i tabell 7-2, viser at alle fraksjonene inneholder mye arabinose, galaktose, glukose og galakturonsyre. I tillegg inneholder de fleste fraksjonene endel xylose, mannose og rhamnose, men det ser ut til å være mindre mengder fucose og glukuronsyre. Funnene, spesielt i de sure fraksjonene, er typiske for pektintype polysakkarider som AG-I, AG-II, RG-I og RG-II, som har høyt innhold av arabinose, galaktose og uronsyrer (galA og glcA) i tillegg til rhamnose (Paulsen & Barsett, 2005). Glukose er ikke så vanlig i pektintype polysakkarider, men kan komme fra glassutstyr som ikke er tilstrekkelig vasket eller fra andre forurensningskilder underveis. Det ser likevel ut til at glukoseinnholdet minsker etter hvert som fraksjonene blir rensset. Det er også funnet noe 4-O-metyl-glukuronsyre (4-O-met-glcA) i flere av fraksjonene. Ved undersøkelse av standarder av 4-O-met-glcA gir dette monosakkaridet opphav til to topper i GC-kromatogrammet, hvorav den ene har samme retensjonstid som fenoliske forbindelser. Dersom prøven har stort innhold av fenoliske forbindelser vil det være vanskelig å si noe om innholdet av 4-O-met-glcA. Mengden av hvert enkelt monosakkarid varierer mellom

ekstraktene, men også mellom de ulike fraksjonene fra hvert ekstrakt.

Monosakkaridsammensetningen i ekstraktene er diskutert under.

### **96 % etanol ekstraktet**

Ekstraksjon med 96 % etanol trekker stort sett ut lavmolekylære fenoler og karbohydrater, og det forventes ikke at råekstraktet (96 %RÅ) inneholder store mengder pektintype polysakkarider. Resultatene tyder på at 96%RÅ inneholder omtrent 40 % sukker. Dette betyr at fraksjonen også inneholder en rekke andre forbindelser, og på grunn av ekstraktets farge er det sannsynlig at det er endel fenoliske forbindelser tilstede. Resultatene fra monosakkaridsammensetningsanalysen indikerer at fraksjonen inneholder mye glukose, og dette kan være fra cellulose i plantecelleveggen. Ettersom det er funnet lite arabinose, galaktose, uronsyrer (galA og glcA) og rhamnose i 96%RÅ tyder dette på lavt innhold av pektintype polysakkarider.

### **50 % etanol ekstraktet**

Resultatene tyder på omtrent 30 % innhold av sukker i råekstraktet (50%RÅ) og 35 % i metanolfaksjonen fra Amberlite XAD-7 (50%MET), mens de sure fraksjonene (50%S1-S5) inneholder over 80 % sukker. Innholdet av arabinose, galaktose, og galakturonsyre er høyest i 50%S1-S5, og disse fraksjonene inneholder også litt fucose og glukuronsyre. Innholdet av xylose og glukose derimot er mindre i 50%S1-S5 enn i 50%RÅ, 50%MET og fraksjonen etter Amberlite XAD-7 (50%AMB). Ettersom 50%S1-S5 inneholder arabinose, galaktose og uronsyrer (galA og glcA) og rhamnose, tyder dette på innhold av pektintype polysakkarider. Ved å fellingsreaksjon med Yariv reagens ble det vist innhold av arabinogalaktan i alle fraksjonene (resultat 7.5.2). Dette støtter funnene av pektintype polysakkarider.

### **50 °C vann ekstraktet**

Råekstraktet (50vRÅ) ser ut til å inneholde rundt 30 % sukker. Fraksjonen etter gelfiltrering med Bio-Gel® P-6 (50vB) inneholder omtrent 65 % sukker, mens de sure fraksjonene (50vS1-S5) inneholder 70-90 %. Det ble funnet arabinose, rhamnose, xylose, galaktose og uronsyrer (galA og glcA) i alle fraksjonene, noe som tyder på innhold av pektintype polysakkarider. Dette ble bekreftet med fellingsreaksjon med Yariv reagens, der det ble vist innhold av arabinogalaktan i alle fraksjonene (resultat 7.5.2) I tillegg tyder resultatene på innholdet av mannose og glukose, men innholdet av disse blir mindre etter gelfiltrering med

Bio-Gel® P-6 og ionebytterkromatografi med ANX Sepharose. Det er generelt lite fucose i fraksjonen, men noe er funnet i 50vS1-S5.

### **100 °C vann ekstraktet**

Resultatene viser at sukkerinnholdet er omtrent 40 % i råekstraktet (100vRÅ) og 70 % i fraksjon 2 etter Bio-Gel P-6 (100vB<sub>2</sub>). I de sure fraksjonene er sukkerinnholdet fra 75-100 %, med unntak av 100vB<sub>1</sub>S5, som kun inneholder 22,3 %. Analysen av monosakkaridsammensetningen indikerer at alle fraksjonene inneholder arabinose, rhamnose, xylose, galaktose og galakturonsyre. Dette tyder på innhold av pektintype polysakkarider. Ved å felle med Yariv reagens ble innhold av arabinogalaktan vist i alle fraksjonene (resultat 7.5.2), og dette støtter teorien om innhold av pektintype polysakkarider. Innholdet av fucose er lavt i alle fraksjonene, og det er lite glukose i 100 °C vann fraksjonene i forhold til de andre ekstraktene. Det ser forøvrig ikke ut til å være klare forskjeller i sukkerinnhold eller monosakkaridsammensetning mellom ionebytterfraksjonene fra gelfiltreringsfraksjon 1 (B<sub>1</sub>S1-S5) og gelfiltreringsfraksjon 2 (B<sub>2</sub>S1-S5).

Ara (%)		Rha (%)	Fuc (%)	Xyl (%)	Man (%)	Gal (%)	Glu (%)	GlcA (%)	4-O-met GlcA (%)	GalA (%)	Totalt sukkerinnhold (%)
96 % etanol											
96vRÅ	0,5	0,8	spor	2,7	6,6	0,8	60,0	spor	23,4	5,2	51,1
50 % etanol											
50vRÅ	7,7	2,8	spor	15,1	6,2	7,5	43,4	spor	6,8	10,6	27,4
50vMET	6,7	2,4	spor	18,6	2,7	3,8	57,2	2,7	3,2	2,6	35,8
50vAMB	7,5	2,8	spor	13,5	9,2	10,0	28,6	spor	11,3	17,1	100,0
50vB	16,5	4,7	0,3	5,8	7,0	22,7	6,9	3,2	2,7	30,1	60,7
50vS1	36,8	4,0	0,2	4,2	11,7	18,8	9,2	1,5	0,7	12,9	94,6
50vS2	24,3	2,3	0,2	3,5	14,7	28,9	5,9	2,1	1,4	16,8	100,0
50vS3	16,8	2,8	0,2	3,0	6,1	21,3	3,5	2,8	1,8	41,8	100,0
50vS4	15,3	6,0	0,3	4,1	3,4	17,9	3,3	2,8	2,4	44,6	85,8
50vS5	10,2	8,2	0,3	5,2	2,5	12,1	2,7	2,9	3,8	52,1	99,9
50 °C vann											
50vRÅ	10,4	6,2	spor	11,3	3,3	10,7	13,7	spor	9,9	34,4	29,6
50vB	13,1	7,0	1,1	11,8	4,8	11,6	11,0	1,9	1,2	36,6	66,6
50vS1	8,1	1,1	3,2	25,2	16,0	15,4	29,4	spor	spor	1,6	79,6
50vS2	11,1	0,8	0,8	33,2	10,3	13,1	13,5	1,4	3,8	11,9	89,4
50vS3	10,5	2,3	0,3	7,1	2,8	10,8	4,4	1,2	1,3	59,4	75,2
50vS4	8,0	10,2	0,4	4,6	1,0	9,8	3,1	2,4	1,4	59,0	80,2
50vS5	7,7	12,1	0,4	4,2	1,6	10,0	3,7	3,4	1,9	55,0	70,3
100 °C vann											
100vRÅ	15,6	5,8	spor	9,9	8,0	9,6	15,9	spor	spor	35,2	41,5
100vB2	16,2	5,7	0,7	10,9	10,1	10,6	11,7	1,9	1,0	31,3	68,2
100vB1S1	30,2	1,2	1,3	13,4	17,3	14,5	19,0	1,7	spor	1,4	100,0
100vB1S2	34,7	3,9	0,3	12,2	7,8	16,9	6,4	1,9	1,1	14,8	100,0
100vB1S3	21,4	10,1	0,4	5,6	1,8	11,8	3,5	2,1	0,8	42,5	100,0
100vB1S4	7,8	10,9	1,1	3,2	1,0	8,5	2,8	2,2	1,0	61,3	100,0
100vB1S5	9,4	11,2	0,3	3,4	1,7	9,3	4,2	1,8	1,2	57,4	22,3
100vB2S1	11,9	1,0	0,8	9,0	30,9	11,8	25,4	spor	spor	9,3	96,7
100vB2S2	17,4	0,9	0,4	21,3	24,0	10,9	16,2	0,8	2,0	6,1	100,0
100vB2S3	15,2	2,1	0,3	27,9	11,5	11,0	9,1	spor	3,3	19,6	96,6
100vB2S4	12,5	8,7	0,4	7,4	2,1	9,9	3,7	2,1	0,9	52,3	85,4
100vB2S5	7,7	10,4	0,5	3,7	1,8	8,9	4,5	2,0	0,9	59,6	73,1

Tabell 7- 2 Oversikt over monosakkaridsammensetning i alle fraksjoner. Ara; arabinose, Rha; rhamnose, Fuc; fucose, Xyl; xylose, Man; mannose, Gal; galaktose, Glu; glukose, GlcA1; glukuronsyre topp 1, GlcA3; glukuronsyre topp 3, GalA; galakturonsyre

## 7.5 Struktur og bindingsforhold

### 7.5.1 Metylering

For å undersøke bindingsmønster mellom monosakkaridene ble polysakkaridene karboksylsyreredusert og deretter metylert, hydrolysert, redusert og acetylt, før de ble separert og analysert på GC-MS. Fordelingen av de ulike bindingene er beregnet ut i fra areal under kurven (AUC) til toppene i GC-kromatogrammet og masseforholdene til fragmentene i MS-spektrene. Ved å samkjøre resultatene fra metyleringsanalysen med monosakkaridsammensetningen fra metanolysen, får man en oversikt over fordeling av hver bindingstype i den enkelte fraksjonen.

Bindingsmønster ble undersøkt i følgende fire fraksjonene, ettersom disse viste høyest komplementfikserende aktivitet (metode 6.4.1):

- 50%S1, fraksjon fra 50 % etanolekstrakt isolert etter ionebytterkromatografi
- 50%S3, fraksjon fra 50 % etanolekstrakt isolert etter ionebytterkromatografi
- 50vS1, fraksjon fra 50 °C vannekstrakt isolert etter ionebytterkromatografi
- 100vB<sub>1</sub>S2, fraksjon fra 100 °C vannekstrakt isolert etter ionebytterkromatografi

### *Tolkning og diskusjon av resultatene*

Resultatene er presentert i tabell 7-3. Galaktose (nøytral) og galakturonsyre (fri uronsyre gruppe) har samme retensjonstid i denne metoden, men de kan likevel skilles.

Galakturonsyrene ble aktivert med carbodiimid før reduksjon, og det ble dannet 6,6-dideuteriosukkerer (metode 6.6.1). 6,6-dideuteriosukkerene kan skilles fra nøytrale monosakkarider på grunn av dannelsen av fragmenter med større masse ( $M^+ + 2$ ) i MS-spekteret. Det samme gjelder for glukose og glukuronsyre. Mengdefordeling mellom det nøytrale monosakkaridet og uronsyren kan anslås ved å se på forholdet mellom fragment-toppene i MS-spekteret.

Alle de fire fraksjonene ser ut til å inneholde endel terminale monosakkarider, spesielt arabinose og xylose, men også galaktose, glukose og uronsyre (galA og glcA). 50%S1 og 100vB<sub>1</sub>S2 inneholder rundt 24 % terminale enheter, mens 50%S3 inneholder rundt 21 % og 50vS1 inneholder omtrent 29 %. Høyt innhold av terminale monosakkarider tyder på mye forgreining i polysakkaridene.



I arabinogalaktan I (AG-I) er typiske bindinger terminal-, 1,5- og 1,3/4-Ara i tillegg til 1,4-Gal (Schols & Voragen, 2002; Paulsen & Barsett, 2005). Det er bare funnet 1,4-Gal i 50vS1, noe som kan tyde på at det kun er denne fraksjonen som kan inneholde AG-I strukturen. I denne fraksjonen er det også funnet mye terminale arabinoser, som er med på å støtte teorien om at fraksjonen inneholder AG-I.

Typiske bindinger i arabinogalaktan II (AG-II) er 1,3- og 1,6-bundet Gal, i tillegg til forgrenede galaktoseenheter (1,3/6-Gal) og terminal-, 1,3 og 1,5-bundet Ara (Paulsen & Barsett, 2005). Det er ikke funnet 1,6-Gal i noen av fraksjonene, men 1,3-Gal er derimot tilstede i alle. Dette kan likevel tyde på innhold av AG-II, men hovedkjeden består da kun av 1,3-bundet galaktose. 1,3/6-Gal er tilstede i stor grad i 50%S1 og 50%S3, henholdsvis 14,1 og 13,4 %, og dette tyder på stor grad av forgrening i disse fraksjonene. Det er bare funnet 1,5 % galaktose 1,3/6-bundet i 50vS1. I 100vB1S2 er det ikke detektert noen forgreningsspunkt for galaktose. Likevel kan det være at AG-II er tilstede i 50vS1 og 100vB1S2, men at det ikke er forgrenet i stor grad. Som nevnt er det detektert terminal Ara i alle fraksjonene, og i tillegg ser det også ut til at fraksjonene inneholder 1,2- og 1,3-bundet Ara. Ettersom disse har samme retensjonstid kan de ikke separeres med denne metoden. Det er også funnet 2,3-O-metyl-Ara, som tyder på 1,4-bundet arabinose i pyranoseform eller 1,5-bundet arabinose i furanoseform. Ettersom 1,5-bundet Ara er typisk for AG-II kan det antas at store deler av 2,3,-O-metyl-Ara er bundet slik. Selv om de ovennevnte arabinosebindingene er funnet i alle de fire fraksjonene, ser det ut til å være høyest innhold i 50%S1 og 100vS1B2, men resultatene tyder også på relativt høyt innhold i 50%S3. 50vS1 derimot, ser ikke ut til å inneholde særlige mengder av arabinosebindingene som er typisk for AG-II. Fellingsreaksjonen med Yariv reagens (resultat 7.5.2) viser at alle de fire fraksjonene inneholder AG-II, men at mengden varierer. 50%S3 ser ut til å inneholde mest AG-II, 50%S1 og 100vB1S2 ser ut til å inneholde forholdsvis mye AG-II, mens 50vS1 ser ut til å inneholde mindre mengder AG-II. Ettersom de fire fraksjonene inneholder en eller flere av de typiske bindingene i AG-II strukturen, og dette stemmer med resultatene fra fellingsreaksjonen med Yariv reagens, er det sannsynlig at AG-II er tilstede i alle fraksjonene.

Typiske bindinger i RG-I strukturen er 1,4-GalA og 1,2-Rha fra den alternerende hovedkjeden (Paulsen & Barsett, 2005). Rhamnoseenheterne er ofte forgrenet i posisjon 4, og dermed inneholder RG-I også 1,2/4-Rha. Alle disse bindingstypene er funnet i 50%S1 og 100vB1S2, og det kan dermed tyde på at disse fraksjonene inneholder RG-I. Det er også

funnet små mengder 1,2-Rha og 1,4-GalA i 50vS1, men ikke 1,2/4-Rha. Det kan likevel være at det finnes RG-I i denne fraksjonen, men at strukturen ikke er veldig forgreinet, og at forgreiningspunktet dermed ikke er detektert. Det ser ikke ut til å være noe RG-I i 50%S3.

RG-II har hovedkjede av 1,4-GalA med forgreningspunkter i 3 og 4, der oligosakkaridkjeder ofte er bundet (Schols & Voragen, 2002). Det vil dermed forventes at 1,4- og 1,3/4-GalA vil detekteres dersom RG-II er tilstede. Alle fraksjonene inneholder 1,4-GalA, men det er ikke detektert 1,3/4-bundet galakturonsyre. Det er ikke forsøkt å påvise tilstedeværelse av sjeldne sukre som kan støtte teorien om innhold av RG-II. Det kan dermed antas at det er lite eller ikke noe RG-II tilstede i fraksjonene.

Homogalakturonaner (HGA) inneholder lange kjeder av 1,4-GalA, og er typiske strukturer i pektintype polysakkarider (Paulsen & Barsett, 2005). Alle fraksjonene inneholder denne bindingstypen, men 50%S3 fraksjonen skiller seg ut ved at denne har markant større innhold enn de andre, med 41,4 %. Innholdet i 50%S1, 50vS1 og 100vB1S2 er på henholdsvis 9,0 %, 1,6 % og 14,6 %. Det ser derfor ut til at alle fraksjonene inneholder homogalakturonankjeder. Høyt innhold av terminal xylose og i tillegg 1,3/4-bundet GalA kan tyde på tilstedeværelse av xylogalakturonaner (XGA). Resultatene indikerer at alle fraksjonene inneholder endel terminale xyloser, men det er ikke detektert 1,3/4-GalA. 50VS1 inneholder 17 % terminale xyloser, og det kan antas at noen av disse er bundet som XGA, men at metoden ikke har kunnet detektere 1,3/4-GalA.

Ut i fra resultatene fra monosakkaridsammensetningen og bindingsanalysen, ser det ut til at 50vS1 og 50%S1 inneholder andre strukturelle enheter i tillegg til de typiske pektintypepolysakkaridene. Disse fraksjonene inneholder bindinger som kan tyde på innhold av mannaner, galaktomannaner og xyloglukaner. Dette er strukturer som er funnet å være tilstede i celleveggpolysakkaridene til frø, og dermed kan disse komme fra frøene i svarthyllbærene (Buckeridge *et al.*, 2000). Xyloglukaner er 1,4-bundet glukose forgreinet i 6-posisjon med terminal-Xyl. Noen av xyloseenhetene er forgreinet i 2-posisjon med galaktopyranose (Cui *et al.*, 2007). Det vil dermed forventes å finne 1,4- og 1,4/6-Glu, tillegg til terminal- og 1,4-Xyl. Eventuelt vil det også kunne finnes 1,2-Xyl og terminal galaktose (p). Resultatene fra metyleringsanalysen viser at 50vS1 og 50%S1 inneholder mye 1,4- og 1,4/6-Glu, i tillegg til terminal- og 1,4-Xyl, og dette tyder på innhold av xyloglukaner, enten fra svarthyllbærenes frø eller fra hemicellulose.

Mannaner er kjeder av 1,4-Man, og galaktomannaner består av  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Man med 1 $\rightarrow$ 6-Gal bundet til seg. (Buckeridge *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2007). Ved tilstedeværelse av disse strukturene vil det dermed kunne detekteres 1,4- og 1,4/6-Man, i tillegg til terminal-Gal. Mannaner forøvrig er uløselige i vann, og dermed er det ikke sannsynlig at disse er tilstede i fraksjonene. Den eneste mannosen som er detektert er i 50vS1, og denne ser ut til å være 1,6-bundet. Ut i fra tidligere studier som har vært gjort har 1,4-Man og 1,4-Gal/GalA lik relativ retensjonstid og vil komme ut i samme topp i GC-kromatogrammet. Det samme gjelder 1,4/6-Man og 1,4/6-Gal/GalA (Palsdottir, 2007). De fire fraksjonene inneholder 6-17% mannose, og på grunn av metodens dårlige evne til å separere galaktose-, galakturonsyre- og mannose-toppene, kan mannosen ligge gjemt i kromatogrammet. Det er derfor mulig at fraksjonene likevel inneholder galaktomannaner, selv om det ikke er detektert forgreiningspunkter for mannose.

Visse strukturelle trekk er assosiert med komplementfikserende evne, hovedsaklig RG-I og AG-II, men også AG-I og en dimer av RG-II (Paulsen & Barsett, 2005). De fire fraksjonene ble undersøkt for bindingsmønster på grunn av at de viste høyest komplementfikserende evne, og alle fraksjonene inneholder en eller flere av de kjente komplementfikserende strukturene. Høyest aktivitet er funnet for 50%S3, og denne fraksjonen ser ut til å inneholde mye terminale og noe forgrenede arabinoser, samt store mengder GalA. Fraksjonen ser ut til å inneholde store mengder HGA og AG-II. 50%S3 har også høyest innhold av glukuronsyre av de fire fraksjonene.

### ***Usikkerhet/feilkilder***

Metoden for metyleringsprosessen er lang og inneholder mange trinn. Det ble klumpdannelse da prøvene ble løst i DMSO, og disse ville aldri løse seg helt opp. Det ble forsøkt å løse prøvene på ultralydbad, samt å la de stå over natten med argongass. Disse tiltakene hjalp betraktelig. Det var også vanskelig å tørke prøvene med nitrogengass. Prøvene sto dobbelt så lenge som de skulle, men likevel var det antydninger til væske i metyleringsrørene, og det så ut til å være noe geldannelse. Prøvene ble dermed tørket 3 ganger så lenge som i den oppgitte metoden, og tilslutt var de tilsynelatende tørre. Det ble antatt at nok prøve hadde reagert slik det skulle til at forbindelsene kunne detekteres, ettersom MS-detektoren er meget sensitiv.

Fraksjoner fra bærekstrakter - *Sambucus nigra*

	Binding	Metylerte posisjoner	50%S1	50%S3	50vS1	100vB1S2
<b>Arabinose</b>	Terminal f	2,3,5	16,4	10,7	3,7	12,4
	Terminal (p)	2,3,4	--	--	--	4,0
	1,2 og 1,3	2,5 og 3,5	7,5	2,6	2,9	8,8
	1,4 eller 1,5	2,3	11,8	3,2	0,8	8,8
	1,3/5 eller 1,3/4	2	--	--	0,5	0,7
	1,2/5 eller 1,2/4	3	1,2	0,3	0,1	
<b>Xylose</b>	Terminal (p)	2,3,4	1,9	3,0	17,0	6,6
	1,4	2,3	2,3	--	8,2	5,6
<b>Rhamnose</b>	Terminal (p)	2,3,4	--	--	0,5	--
	1,2	3,4	2,3	--	0,5	2,5
	1,3	2,4	--	2,8	0,1	--
	1,2/4	3	1,7	--	--	1,4
<b>Mannose</b>	1,6	2,3,4	--	--	16,0	--
<b>Galaktose</b>	Terminal (p)	2,3,4,6	--	3,0	5,4	0,9
	1,4	2,3,6	--	--	3,0	--
	1,3	2,4,6	4,7	2,8	3,9	5,4
	1,3/4	2,6	--	0,8	0,7	--
	1,2/4	3,6	--	1,4	0,8	10,6
	1,3/6	2,4	14,1	13,4	1,5	--
<b>Glukose</b>	Terminal (p)	2,3,4,6	--	1,0	2,0	4,2
	1,2	3,4,6	--	--	0,3	2,2
	1,4	2,3,6	9,2	1,5	9,7	--
	1,4/6	2,3	--	1,0	17,4	--
<b>Glukuronsyre</b>	Terminal (p)	2,3,4,6	1,5	2,8	--	--
<b>Galakturonsyre</b>	Terminal (p)	2,3,4,6	3,9	0,4	--	0,2
	1,4	2,3,6	9,0	41,4	1,6	14,6
<b>SUM</b>			<b>87,4</b>	<b>92,0</b>	<b>96,8</b>	<b>88,9</b>
<b>Ikke funnet bindingsmønster</b>						
	Mannose		11,7	6,1		7,8
	Fucose		0,2	0,2	3,2	0,3
	4-O-metyl glcA*			1,8		1,1
	Glukuronsyre		0,7			1,9
<b>SUM**</b>			<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Tabell 7- 3 % fordeling av bindinger i svarthyllbærfraksjonene. \*4-O-metyl-GlcA kan ikke detekteres med denne metyleringsmetoden. \*\*Inkluderer monosakkaridene der det ikke er funnet bindingsmønster.

### 7.5.2 Innhold av arabinogalaktan II (AG-II)

Arabinogalaktaner er viktige pektinstrukturer, ettersom flere studier viser komplementfikserende aktivitet fra ekstrakter og fraksjoner som inneholder disse strukturene. Dermed er det nyttig å bestemme innholdet av arabinogalaktaner (AG). Tilstedeværelse av AG ble undersøkt med Yariv Reagent System. En standardløsning ble benyttet som positiv kontroll. 2, 4 og 6 µl av hver prøve og standard ble tilsatt brønnene i en gelbondfilm (se metode 6.6.2). Ved positiv reaksjon vil AG felles ut med Yariv reagens, og dette vil kunne detekteres som røde ringer rundt brønnene. Arabinogalaktan I (AG-I) vil ikke felles ut med Yariv reagens. En positiv reaksjon i dette systemet vil dermed tyde på at AG-II er tilstede (Paulsen & Barsett, 2005).

	50 %	50 °C	100 °C	Standard
<b>Kraftig farge, diameter 9 - 11 mm</b>	50%S2-S4	50vS2	--	--
<b>Tydelig farge, diameter 7 - 8 mm</b>	50%S1 og S5	50vS5	100vB <sub>1</sub> S2	Alle
<b>Noe farge, diameter 5 - 6 mm</b>	--	50vS3	100vB <sub>1</sub> S1 100vB <sub>2</sub> S2 og S3	--
<b>Svak farge, diameter 3 - 4 mm</b>	50%RÅ	50vRÅ 50vS1 og S4	100vRÅ 100vB <sub>1</sub> S3-S5 100vB <sub>2</sub> S1, S4 og S5	--

*Tabell 7- 4 Resultater fra Yariv Reagent System. Resultatene er klassifisert på grunnlag av fargen og størrelsen til ringen rundt brønnen der 6 µl av prøver og standard ble tilsatt.*

I tillegg til at fargen på ringene ble vurdert ble diameteren på ringen rundt brønnene som var tilsatt 6 µl prøve eller standard målt. Tabell 7-4 viser en oversikt over resultatene. Ringene som ble dannet rundt brønnene med standardløsning viste doseavhengig reaksjon med Yariv reagens på alle platene. Dette tyder på at forsøket har gått korrekt for seg. Alle de testede fraksjonene reagerte med Yariv reagens, også ved de laveste konsentrasjonene. Dette tyder på at de inneholder arabinogalaktan II (AG-II). Det er forøvrig noen av fraksjonene som skiller seg ut ved at reaksjonen var ekstra kraftig, spesielt de sure fraksjonene 50%S2-S4. Forholdsvis kraftig reaksjon ble også observert for de sure fraksjonene 50vS2, 50vS5 og 100vB<sub>1</sub>S2-S3. Råekstraktene ser ut til å innholde minst AG-II. Ettersom resultatene fra Yariv Reagent System viser tilstedeværelse av AG-proteiner i alle fraksjonene, og støttes teorien om tilstedeværelsen av AG-II fra metyleringsresultatene.

## 8. Konklusjon

Polysakkarider ble ekstrahert fra *Sambucus nigra* med 96 % etanol, 50 % etanol, 50 °C vann og 100 °C vann. Ved å benytte adsorpsjonskromatografi med Amberlite XAD-7, gelfiltrering med Bio-Gel® P-6 og ionebytterkromatografi med ANX sepharose ble polysakkarider isolert etter størrelse og ladning. Resultatet var 30 fraksjoner (se figur 3-1). Biologisk aktivitet ble vist i flere testsystemer. Alle fraksjonene ser ut til å ha komplementfikserende aktivitet, og de fleste fraksjonene viste høyere aktivitet enn standardfraksjonen fra *Plantago major* (PMII). Aller høyest aktivitet ble vist for fraksjonene 50%S2-S3, 50vS1-S2, 100vB<sub>1</sub>S1-S2 og 100vB<sub>2</sub>S1-S3. Disse fraksjonene er de minst ladete ionebytterfraksjonene fra alle ekstraktene, og inneholder høymolekylære sure polysakkarider. Makrofagaktiverende aktivitet ble funnet i råekstraktene fra ekstraksjonene med 50 % etanol, 50 °C vann og 100 °C vann, og det ser ut til at 50%RÅ og 100vRÅ er mest aktive. Det ser ut til at de lavmolekylære fraksjonene 96%RÅ og 50%MET hemmer CYP3A4, mens 50%RÅ, 50%B, 50vRÅ, 100vRÅ stimulerer CYP3A4. Svarthyllbærenes antimikrobielle effekt ble undersøkt, og det ble funnet at fraksjonene viser tegn til bakteriostatisk effekt mot *K. Rhizophilia*, *B. subtilis* og *C. albicans*. men ikke *E. coli*, *S. aureus* eller *P. aeruginosa*.

Ved å undersøke monosakkaridsammensetningen ble høyt innhold av arabinose (Ara), galaktose (Gal), galakturonsyre (GalA), glukose (Glu), mannose (Man) og xylose (Xyl) funnet i alle fraksjonene. Dette er monosakkarider som er typiske i pektintype polysakkarider. Bindingsforhold ble undersøkt i fire fraksjoner med høy komplementfikserende aktivitet, 50%S1, 50%S3, 50vS1 og 100vB<sub>1</sub>S2 (se figur 3-1). Det ble funnet terminal-, 1,5- og 1,3/4-Ara i tillegg til 1,4-Gal, som er typisk for arabinogalaktan I (AG-I). I tillegg ble det funnet 1,3- og 1,3/6-bundet Gal, samt 1,3- og 1,5-Ara, og dette kan tyde på innhold arabinogalaktan II (AG-II). Det ble også detektert 1,4-GalA og 1,2-Rha, som er typiske bindinger i rhamnogalakturonan I (RG-I). I tillegg ble det funnet så høyt innhold av 1,4-GalA at det også må være homogalakturonan (HGA) tilstede.

Fellingsreaksjonen med Yariv reagens viste innhold av arabinogalaktaner av AG-II type i råekstraktene og alle de sure fraksjonene. AG-I, AG-II, RG-I er strukturer som tidligere er vist å ha komplementfikserende aktivitet. Resultatene viser at de fire fraksjonene med høy aktivitet i komplementsystemet også sannsynligvis inneholder disse strukturene som er typiske for polysakkarider av pektintype.

## Kildeliste

- Aarnes H. 2000. *Planteanatomi, Celleveggen - forutsetning for turgortrykk*. Hentet 20.04.2008, fra <http://biologi.uio.no/plfys/haa/anatomi/vegg.htm#Cellevegg>
- Advanced Biosciences. 2008. *Amberlite TM XAD TM Adsorbent Resins for Capture, Desalting and Decolorization*. Hentet 07.04.08, fra <http://www.rohmhaas.com/ionexchange/pharmaceuticals/xad.htm>
- Amersham Pharmacia Biotec AB. (2000). ANX Sepharose Fast Flow (high sub) Instructions. Faktablad til kolonnemateriale.
- Atkinson MD & Atkinson E. (2002). Biological Flora of the British Isles, *Sambucus nigra* L. *Journal of Ecology* **90**, 895-923.
- Bell CD. 2004. *Dipsacales*. Hentet 01.05.08, fra <http://tolweb.org/Dipsacales/20743/2004.07.31>
- Bell DR & Gochenaur K. (2006). Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *Journal of Applied Physiology* **100**, 1164-1170.
- Bio-Rad Laboratories. 2000. *Bio-Gel P Polysacrylamid Gel Instruction Manual pdf*. Hentet 16.11.07, fra <http://www.bio-rad.com>
- Biosupplies. Yariv Reagents For Detection and Quantitation of Arabinogalactan-proteins. Faktablad til reagenset.
- Buckeridge MS, Santos HPd & Tine MAS. (2000). Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiol Biochem* **38**, 141-156.
- Chambers RE & Clamp JR. (1971). An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. *Biochemical Journal* **125**, 1009-1018.
- Chevallier A. (1996). *Encyclopedia of Medicinal Plants*. pp. 131-132. Dorling Kindersley Limited.
- Christensen H. (2008). Professor ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap. Personlig meddelelse, 2008.
- Ciucanu I. (2006). Per-O-methylation reaction for structural alalysis of carbohydrates by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **576**, 147-155.

- Ciucanu I & Kerek F. (1984). A Simple and Rapid Method for the Permethylolation of Carbohydrates. *Carbohydrate Research* **131**, 209-217.
- Cui SW, Ikeda S & Eskin MNA. (2007). Seed Polysaccharide Gums. In *Functional Food Carbohydrates*, ed. Biliaderis CG & Izydorczyk MS, pp. 127-129, 138-143.
- Donoghue MJ, Eriksson T, Reeves PA & Olmstead RG. (2001). Phylogeny and phylogenetic taxonomy of Dipsacales, with special reference to Sinadoxa and Tetradoxa (Adoxaceae). *Harvard Papers in Botany* **6**, 459-479.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA & Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.
- Fremstad E & Elven R. (1998). Fremmede planter i Norge Hyll-arter Sambucus spp. *Blyttia* **57** (1), 37-45.
- Geda SZ. 1943. *Myths & Legends of Black Elderberry*. Hentet fra <http://www.paghat.com/elderberrymyths.html>
- Greibrokk T, Lundanes E & Rasmussen KE. (2005). *Kromatografi; Separasjon og Deteksjon*. pp. 60-78. Pensumtjeneste A/S Oslo.
- Greibrokk T, Lundanes E & Rasmussen KE. (2005). *Kromatografi; Separasjon og deteksjon*. pp. 80-91. Pensumtjeneste A/S, Oslo.
- Grieve M. (1931). *A Modern Herbal*, vol. 1. pp. 265-274. Harcourt, Brace & Company, London.
- Hjelmstad R. 2007. *Svarthyll - god å ty til ved forkjølelse og influensa*. Hentet 25.01.08, fra [http://www.rolv.no/urtemedisin/artikler/samb\\_nig/art1.htm](http://www.rolv.no/urtemedisin/artikler/samb_nig/art1.htm)
- Hjelmstad R. 2008. *SVARTHYLL Sambucus Nigra*. Hentet 03.12.07, fra [www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/samb\\_nig.htm](http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/samb_nig.htm)
- Izydorczyk M. (2005). Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates. In *Food Carbohydrates, Chemistry, Physical Properties and Applications*, ed. Cui SW, pp. 51-69. Taylor & Francis.
- Izydorczyk M. (2005). Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates. In *Food Carbohydrates, Chemistry, Physical Properties and Applications*, ed. Cui SW, pp. 2-27, 51-63. Taylor & Francis Group.



- 
- J.W. Cappelens Forlag AS. 2008. *Calpex*. Hentet 14.04.08, fra <http://www.caplex.no/Web/ArticleView.aspx?id=9400732>
- Johnson WW. (2008). Cytochrome P450 Inactivation by Pharmaceuticals and Phytochemicals: Therapeutic Relevance. *Drug Metabolism Reviews* **40**, 101-147.
- Kim J-B & Carpita NC. (1992). Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles. *Plant Physiology* **98**, 646-653.
- Lundanes E. (1994). *Koplinger med MS*. 255-274. Universitetsforlaget.
- Michaelsen TE, Gilje A, Samuelsen AB, Høgåsen K & Paulsen BS. (2000). Interaction Between Human Complement and a Pectin Type Polysaccharide Fraction, PMII, from the Leaves of *Plantago Major* L. *Scandinavian Journal of Immunology* **52**, 483-490.
- Molden E. 2006. *CYP450 - historikk og fakta*. Hentet 23.04.08, fra <http://www.cyp450.no>
- Monograph. (2005). *Sambucus nigra* (Elderberry). *Alternative Medicine Review* **10**, 51-54.
- Mumcuoglu M. (1995). *Sambucus Black Elderberry Extract A Breakthrough in the Treatment of Influenza*.
- Natural Medicines. 2008. *Elderberry*. Hentet fra <http://www.naturaldatabase.com>
- Palsdottir BO. (2007). *Methylation analysis of lichen polysaccharides - method developement -. Haskoli Islands - Department of pharmacy. University of Iceland. Master thesis*.
- Paulsen BS & Barsett H. (2005). Bioactive Pectic Polysaccharides. *Advances in Polymer Science* **186**, 69-101.
- Pedersen-Bjergaard S & Rasmussen KE. (2004). *Legemiddelanalyse*. s. 164-182. Fagbokforlaget, Bergen.
- Pedersen-Bjergaard S & Rasmussen KE. (2004). *Legemiddelanalyse*. pp. 264-268. Fagbokforlaget, Bergen.
- Pedersen-Bjergaard S & Rasmussen KE. (2004). *Legemiddelanalyse*. s. 193-211. Fagbokforlaget.

- 
- Pedersen-Bjergaard S & Rasmussen KE. (2004d). *Legemiddelanalyse*. s. 239-268. Fagbokforlaget, Bergen.
- Plantebiosenteret. 2002. *Membranproteiner; Isolering og rensing av proteiner*. Hentet 21.11.07, fra [www.bio.ntnu.no/Plantebiosenteret/Undervisning/forelesning/kap3-v2002del4.pdf](http://www.bio.ntnu.no/Plantebiosenteret/Undervisning/forelesning/kap3-v2002del4.pdf)
- Plants for a Future. 2004. *Edible medicinal and useful plants for a healthier world*. Hentet 28.01.08, fra <http://www.pfaf.org/database/plants.php?Sambucus+nigra>
- Popper ZA. (2008). Evolution and diversity of green plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 1-7.
- Postvoll LW. (2006). *Metabolisme av midazolam via CYP3A4 og CYP3A5 in vitro - Utvikling av LC/MS-metode for analyse av hydroksylerte metabolitter Avdeling for farmasøytisk biovitenskap. Universitetet i Oslo*.
- Praha P. (2005). *The Immune System*. s. 205-222. Garland Science, Taylor & Frances Group.
- Praha P. (2005). *The Immune System*. s. 11-15. Garland Science, Taylor & Frances Group.
- Promega. (2005). Greiss Reagent System; Instructions for use of product G2930. Faktablad til reagenset.
- Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A & Oksman-Caldentey K-M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 494-507.
- Roxas M & Jurenka J. (2007). Colds and Influenza: A Review of Diagnosis and Conventional, Botanical, and Nutritional Considerations. *Alternative Medicine Review* **12**, 25-43.
- Sagberg KM. (2006). *Nye stoffer med effekt på immunsystemet isolert fra sårhelende planter i Mali; polysakkarider fra Combretum glutinosum. Etnofarmakologiske studier i Mali med fokus på viktige medisinsplanter; Kolokani og Dioila Combretum glutinosum. University of Oslo. Master's thesis*.
- Schepetkin IA & Quinn MT. (2006). Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential *International Immunopharmacology* **6**, 317-333.

- 
- Schols HA & Voragen AGJ. (2002). The chemical structure of pectins. In *Pectins and their Manipulations*, ed. Seymour GB & Knox JP, s. 1-18. Blackwell Publishing.
- Sigma-Aldrich. 1998. *AMBERLITE XAD POLYMERIC RESINS Product Information pdf*. Hentet 10.04.08, fra <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/XAD7>
- Sigma-Aldrich. 2007. *Amberlite XAD7HP*. Hentet 11.04.08, fra <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/XAD7>
- Sirnes E. (2003). *Fargestoffer i tropiske planter. Kjemisk institutt. Universitetet i Bergen. Hovedoppgave*.
- Spectrum Laboratories Inc. 2008. *Fundamentals of Membran Dialysis*. Hentet 07.04.08, fra <http://eu.spectrapor.com/dialysis/Fund.html>
- Sweeley CC, Bentley R, Makita M & Wells WW. (1963). Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 2497-2507.
- Taiz L & Zeiger E. (1991). *Plant Physiology*. s. 23-27. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc.
- Tang X-C, He Y-Q, Wang Y & Sun M-X. (2006). The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell developemental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Journal of Experimental Botany* **57**, No. **11**, 2639-2650.
- Taylor & Francis. *Food Carbohydrates, Chemistry, Physical Properties and Applications*. s. 108-121.
- Thole JM, Kraft TFB, Sueiro LA, Kang Y-H, Gills JJ, Cuendet M, Pezzuto JM, Seigler DS & Lila MA. (2006). A Comparative Evaluation of the Anticancer Properties of European and American Elderberry Fruits. *Journal of Medicinal Food* **9**, 498-504.
- Tierra M. 1999. *Herb of the month, May, 1999 Elder (Sambucus Nigra)*. Hentet fra <http://www.planetherbs.com/articles/elder%20.html>
- Vallès J, Bonet MÀ & Agelet A. (2004). Ethnobotany of *Sambucus Nigra* L. In Catalonia (Iberian Peninsula): The Integral Exploitation of a Natural Resource in Mountain Regions. In *Economic Botany*, s. 456-469. The New York Botanical Garden Press, Bronx, New York.

- Vorwerk S, Somerville S & Somerville C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science* **9**, 203-209.
- Wikipedia. 2008. *Sambucus nigra*. Hentet 29.04.2008, fra <http://no.wikipedia.org/wiki/Sambucus>
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W & Knox JP. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* **47**, 9-27.
- World Health Organization. (2002). *WHO monographs on selected medicinal plants* **2**, 269-275.
- Yamada H & Kiyohara H. (1999). Complement-activating polysaccharides fra medicinal herbs. *Immunomodulatory Agents from Plants*, 161-202.
- Yamada H & Kiyohara H. (2007). Immunomodulating Activity of Plant Polysaccharide Structures. *Comprehensive Glycoscience* **4**, 664-673.
- Yang X, Zhao Y, Wang H & Mei Q. (2007). Macrophage Activation by an Acidic Polysaccharide Isolated from *Angelica Sinensis* (Oliv.) Diels. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 636-643.